UNTERSUCHUNGEN ZUR CATECHOLASE- UND CRESOLASE-AKTIVITÄT VON PHENOLOXYDASEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereichs Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulfert Deneke

aus Braunschweig

Berlin 1973

UNTERSUCHUNGEN ZUR CATECHOLASE- UND CRESOLASE-AKTIVITÄT VON PHENOLOXYDASEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulfert Deneke

aus Braunschweig
Berlin 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Als Dissertation angenommen am:

Tag der mündlichen Prüfung:

Tag der Promotion:

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schenck

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. K.-H. Frömming

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 7, 1 Berlin 41

Die vorliegende Dissertation wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Schenck für die Überlassung des Themas und für die große Freizügigkeit, die er mir bei der Bearbeitung und Gestaltung der Dissertation einräumte.
Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming danke ich für die verschiedenen Phenoloxydase-Präparationen, die er mir jederzeit großzügig überließ.
Herr Prof. Dr. R. Hänsel stellte mir freundlicherweise ein Zeiss-Photometer M 4 Q II für ein Jahr zur Verfügung. Dafür gilt ihm ebenfalls mein herzlicher Dank.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0112

Für

Ingeborg und Jan

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung..... 1
2. Problemstellung..... 14
3. Theoretischer Teil..... 15
3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon
als Kupplungsreagenz (3.1.)..... 15
3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-
hydrazon als Kupplungsreagenz (3.2.)..... 22
Allgemeine Versuchsbedingungen zur Bestimmung
der Catecholase- und der Cresolase-Aktivi-
tät (3.3.)..... 3o
Untersuchungen zur Catecholase-Aktivität
von Phenoloxydasen (3.4.)..... 37
Untersuchungen zur Cresolase-Aktivität
von Phenoloxydasen (3.5.)..... 51
Zum Reaktionsmechanismus der Catecholase-
Aktivität (3.6.)..... 67
Zum Reaktionsmechanismus der Cresolase-
Aktivität (3.7.)..... 7o
4. Zusammenfassung..... 76
5. Experimenteller Teil..... 78
Inhaltsverzeichnis (5.1.)..... 78
6. Literaturverzeichnis..... 89

1. Einleitung

1.1. Nomenklatur und Wirkungsweise

1.1.1. Das Ferment Phenoloxydase, häufig als Polyphenoloxydase, Phenolase oder Tyrosinase bezeichnet, gehört nach der Nomenklatur der Enzyme nach Hoffmann-Ostenhoff (1) zur Klasse der Oxydasen oder aeroben Transelektronasen. Das sind Fermente, die Elektronen von einem Donator auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei im Gegensatz zu den aeroben Transhydrogenasen die Reaktion nicht auf der Peroxidstufe stehenbleibt, sondern bis zum O^{2-} führt. Mason fand jedoch, daß bei der Reaktion nach Gleichung I das Ferment nicht nur Elektronen, sondern auch O_2 überträgt (2) und schlug daher den Begriff "mischfunktionelle Oxydasen" für Phenoloxydasen und Enzyme mit gleicher Wirkungsart vor (3).

1.1.2. Nach den bisher erfolgten Untersuchungen vermag die Phenoloxydase zwei prinzipiell verschiedene Reaktionen zu katalysieren:

a.

$$\text{Monophenol} + O_2 \xrightarrow{\text{Ferment}} \text{o-Chinon} + H_2O$$

Gleichung I

b.

$$\text{o-Diphenol} + 1/2\ O_2 \xrightarrow{\text{Ferment}} \text{o-Chinon} + H_2O$$

Gleichung II

Als Substrate für die Reaktion a. seien genannt:

Tyrosin, Phenol, p-Cumarsäure und p-Kresol. Da p-Kresol besonders häufig als Substrat herangezogen wird, spricht man bei dieser Reaktionskatalyse der Phenoloxydase auch von Cresolase-Aktivität (4, 5,6).

Bei der Reaktion b. können neben vielen weiteren o-Diphenolen folgende Substrate eingesetzt werden: Adrenalin, L-Dopa und Brenzcatechin. Bei dieser Art der Reaktionskatalyse durch Phenolase spricht man von Catecholase-Aktivität (4,5,6).

Der Unterschied in den beiden Reaktionen liegt darin, daß bei der Reaktion b. der Sauerstoff zum Wasser reagiert, während er bei der Reaktion a. als Hydroxylierungsmittel wirkt, wie durch Versuche mit radioaktiv markiertem Sauerstoff gezeigt werden konnte (2).

1.1.3. Über den Aufbau der Phenoloxydasen ist noch nicht allzuviel bekannt. Sie wurden unter anderem aus Champignons (7,8,9), Bananen (1o), Neurospora crassa (1o), Mäusemelanin (11) und Hamstermelanin (12) isoliert, wobei jeweils geringe Unterschiede in Verhalten festgestellt wurden. 1937 konnte gezeigt werden, daß es sich um Kupferproteide handelt, in denen das Verhältnis von Cresolase- zu Catecholase-Aktivität ungefähr 1 zu 5 beträgt (5). Bei Versuchen, hochgereinigte Präparationen darzustellen, verschob sich dieses Verhältnis jedoch sehr zugunsten der Catecholase-Aktivität, es gelang sogar, Präparationen darzustellen, die praktisch überhaupt kei-

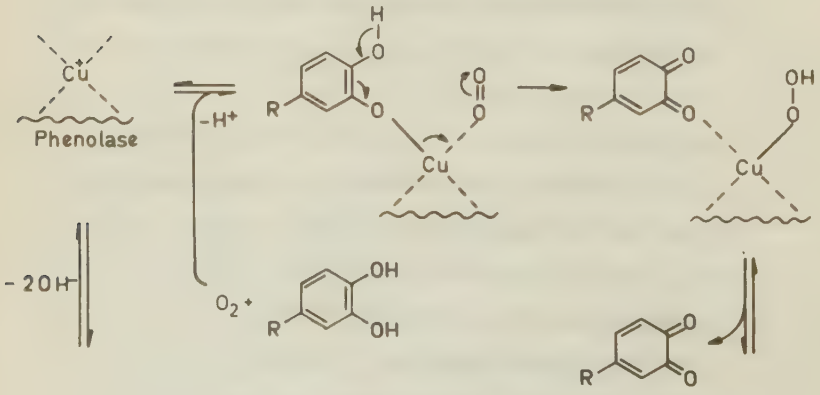
ne Cresolase-Aktivität mehr zeigten (high catecholases) (4). Nach anderen Autoren ist diese Erscheinung dagegen auf Veränderungen am Cresolase-Aktivitätszentrum zurückzuführen (7). Präparationen darzustellen, die ausschließlich Cresolase-Aktivität besitzen, ist nicht möglich (4,5,6), die besten high-cresolase-Präparationen haben ein Verhältnis von Cresolase- zu Catecholase-Aktivität von etwa 1 zu 4. Durch Versuche mit Hilfe der Elektrophorese und der Ultrazentrifuge erkannten Jolley und Mason (13), daß z.B. Champignonphenoloxydase ein Gemisch von Isoenzymen darstellen muß, die möglicherweise untereinander in einem Gleichgewicht stehen, welches von Bedingungen wie pH, Ionenstärke und Eiweißkonzentration abhängig ist.

Das Molekulargewicht beträgt etwa 125 ooo (14), bei hochgereinigten Präparationen soll es um 2oo ooo liegen (6). Es finden sich allerdings auch Angaben über aktive Enzympräparationen mit niedrigerem Molekulargewicht (1o,15), die sogar kristallin dargestellt werden konnten (1o).

Der Gehalt an Kupfer in high-catecholase-Präparationen ist nach Angaben der Literatur etwa achtmal höher als in high-cresolase-Präparationen (6,7,1o, 15). Über die Funktion des Kupfers gibt es zwei verschiedene Ansichten. Ältere Autoren, die sich im wesentlichen auf Kubowitz (5) stützen, postulieren einen ständigen Wertigkeitswechsel zwischen ein- und zweiwertigem Kupfer im Verlauf der Reak-

tionskatalyse. Spätere Untersuchungen (1o,16), besonders an der Komplexbildung von Cu^+ mit 2,2'-Dichinoyl (17), sprechen jedoch eher dafür, daß das Kupfer immer in der einwertigen Form vorliegt. Das wird noch durch die Tatsache gestützt, daß in frisch gewonnenen, hochgereinigten Enzymen der Anteil des Cu^{2+} mit Hilfe der ESR-Methode zu höchstens ein Prozent der Gesamtkupfermenge bestimmt wurde (9,1o). Fest steht aber, daß Kupfer ein essentieller Bestandteil der Phenoloxydasen ist (4,5,18). Einer der Hauptunterschiede der aus verschiedenen Materialien isolierten Phenoloxydasen liegt in ihrer unterschiedlichen Fähigkeit, ihre Aktivität zu regenerieren, wenn ihnen das Kupfer entzogen wurde und anschließend neu zugesetzt wird (4,11,1o,18).

1.1.4. Zur Beschreibung der genaueren Vorgänge bei der Oxydation von Diphenolen mit Phenoloxydasen schlägt Hamilton (19) folgendes Schema vor:



nonen dehydriert. m- und p-Diphenole werden nicht angegriffen. Da die o-Chinone sehr reaktionsfähig sind, können Sekundärreaktionen mit überschüssigem Substrat oder sonstigen Inhaltsstoffen des Reaktionsansatzes eintreten. Soweit dabei o-Diphenole zurückgebildet werden, oder neue entstehen, können diese erneut durch Phenoloxydase dehydriert werden. Beispiele hierfür sind die Melaninbildung aus Tyrosin über L-Dopa (25,26,27,28), oder die Oxydation von Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure durch Brenzcatechin, Luftsauerstoff und Phenoloxydase (29, 30).

Obwohl eine große Anzahl von o-Diphenolen untersucht wurden, finden sich nur wenige, die in Gegenwart von Phenoloxydasen pflanzlicher Herkunft nicht angegriffen werden. Erwähnt seien hier 4-Nitrobrenzcatechin (31), 2,3-Dihydroxyphenyl-Phenylsulfon (32) und 2,3-Dihydroxyphenylsulfonsaures Natrium (31).

1.2.2. Die Wirkungsspezifität tierischer Phenoloxydasen ist recht groß, im wesentlichen wird nur L-Tyrosin hydroxyliert. Dagegen werden von pflanzlichen Phenoloxydasen eine beträchtliche Zahl verschiedener Monophenole angegriffen (31). Diese Zahl erhöht sich noch, wenn Diphenole zur Verkürzung der Induktionsperiode zugesetzt werden.

1.3. Hemmung und Inaktivierung

1.3.1. Im Zusammenhang mit der Frage nach der Bedeutung des Kupfers für die Wirkung der Phenoloxy-

dasen wurde eine große Zahl an Hemmstoffen untersucht. Es stellte sich heraus, daß alle Stoffe, die chemisch mit Kupfer reagieren, eine inkompetitive Hemmung aufweisen. Solche Stoffe sind Cyanid, Diaethylthiocarbamid, Salicylaldoxim, Kohlenmonoxid und Reagentien mit Sulfhydrylgruppen (5,6,33), wie Thioharnstoffe, Thiouracile, Cystein und Glutathion. Einige dieser Reagentien hemmen die Catecholase-Aktivität im gleichen Maße wie die Cresolase-Aktivität (34). Reagentien, die auf Sulfhydrylgruppen einwirken, hemmen Phenoloxydasen nicht.
Als kompetitive Hemmer sind p-Nitrobrenzcatechin und p-Nitrophenol beschrieben (35); spezielle Hemmversuche bei der Melaninbildung ergaben, daß N-Aethyltyrosin, N-Formyltyrosin und 3-Fluortyrosin ebenfalls kompetitiv hemmen (36). Eine kompetitive Hemmung der Dopaoxydation mit Phenoloxydase ergaben auch die Versuche mit dem Triaethanolamin-Titanat-Komplex (37). Besonders bemerkenswert ist, daß 5-Hydroxyindol ein kompetitiver Hemmer der Cresolase- und ein nichtkompetitiver Hemmer der Catecholase-Aktivität sein soll (38). Weitere Hemmversuche werden bei verschiedenen Autoren angegeben (6, 33,39,4o). Quantitative Beziehungen zwischen Hemmstoffkonzentration und Hemmung finden sich ausführlicher bei Cavanaugh, Harris und Hearon (37) beschrieben.

1.3.2. Ein besonderes Phänomen der Phenoloxydasen

nonen dehydriert. m- und p-Diphenole werden nicht angegriffen. Da die o-Chinone sehr reaktionsfähig sind, können Sekundärreaktionen mit überschüssigem Substrat oder sonstigen Inhaltsstoffen des Reaktionsansatzes eintreten. Soweit dabei o-Diphenole zurückgebildet werden, oder neue entstehen, können diese erneut durch Phenoloxydase dehydriert werden. Beispiele hierfür sind die Melaninbildung aus Tyrosin über L-Dopa (25,26,27,28), oder die Oxydation von Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure durch Brenzcatechin, Luftsauerstoff und Phenoloxydase (29, 30).

Obwohl eine große Anzahl von o-Diphenolen untersucht wurden, finden sich nur wenige, die in Gegenwart von Phenoloxydasen pflanzlicher Herkunft nicht angegriffen werden. Erwähnt seien hier 4-Nitrobrenzcatechin (31), 2,3-Dihydroxyphenyl-Phenylsulfon (32) und 2,3-Dihydroxyphenylsulfonsaures Natrium (31).

1.2.2. Die Wirkungsspezifität tierischer Phenoloxydasen ist recht groß, im wesentlichen wird nur L-Tyrosin hydroxyliert. Dagegen werden von pflanzlichen Phenoloxydasen eine beträchtliche Zahl verschiedener Monophenole angegriffen (31). Diese Zahl erhöht sich noch, wenn Diphenole zur Verkürzung der Induktionsperiode zugesetzt werden.

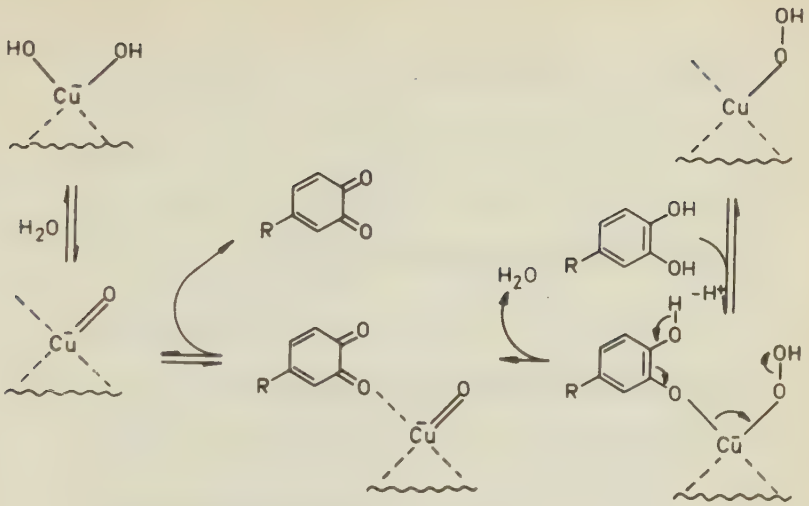
1.3. Hemmung und Inaktivierung

1.3.1. Im Zusammenhang mit der Frage nach der Bedeutung des Kupfers für die Wirkung der Phenoloxy-

dasen wurde eine große Zahl an Hemmstoffen untersucht. Es stellte sich heraus, daß alle Stoffe, die chemisch mit Kupfer reagieren, eine inkompetitive Hemmung aufweisen. Solche Stoffe sind Cyanid, Diaethylthiocarbamid, Salicylaldoxim, Kohlenmonoxid und Reagentien mit Sulfhydrylgruppen (5,6,33), wie Thioharnstoffe, Thiouracile, Cystein und Glutathion. Einige dieser Reagentien hemmen die Catecholase-Aktivität im gleichen Maße wie die Cresolase-Aktivität (34). Reagentien, die auf Sulfhydrylgruppen einwirken, hemmen Phenoloxydasen nicht.

Als kompetitive Hemmer sind p-Nitrobrenzcatechin und p-Nitrophenol beschrieben (35); spezielle Hemmversuche bei der Melaninbildung ergaben, daß N-Aethyltyrosin, N-Formyltyrosin und 3-Fluortyrosin ebenfalls kompetitiv hemmen (36). Eine kompetitive Hemmung der Dopaoxydation mit Phenoloxydase ergaben auch die Versuche mit dem Triaethanolamin-Titanat-Komplex (37). Besonders bemerkenswert ist, daß 5-Hydroxyindol ein kompetitiver Hemmer der Cresolase- und ein nichtkompetitiver Hemmer der Catecholase-Aktivität sein soll (38). Weitere Hemmversuche werden bei verschiedenen Autoren angegeben (6, 33,39,4o). Quantitative Beziehungen zwischen Hemmstoffkonzentration und Hemmung finden sich ausführlicher bei Cavanaugh, Harris und Hearon (37) beschrieben.

1.3.2. Ein besonderes Phänomen der Phenoloxydasen



Gleichung III

Dagegen sind die Vorgänge bei der Hydroxylierung von Monophenolen in Gegenwart von Phenoloxydasen noch nicht so genau bekannt. Einige Tatsachen sind jedoch gesichert. So tritt bei der Reaktion eine Induktionszeit auf (2o,21), die durch Zusatz von o-Diphenolen (21,22) und auch von Reduktionsmitteln wie z.B. Ascorbinsäure aufgehoben oder doch verkürzt wird (2o,23), wogegen Oxydationsmittel diese Phase verlängern (2o). Der zur Hydroxylierung benötigte Sauerstoff stammt ausschließlich aus der zugeführten Luft, wie sich aus Versuchen mit ^{18}O-markierten Sauerstoff ergab (24). Dabei wurde gleichzeitig bestätigt, daß pro Mol hydroxyliertem Monophenol ein Mol O_2 aufgenommen wird, wie es aus Gleichung I hervorgeht.

1.4. Meßmethoden der Enzymaktivität

1.4.1. Zur Messung der Enzymaktivität können verschiedene Verfahren herangezogen werden. Man mißt den Sauerstoffverbrauch, die Abnahme des Substrates, die Zunahme an Reaktionsprodukt ohne oder mit verändernden Zusätzen, oder den indirekten Sauerstoffverbrauch.

1.4.2. Graubard und Nelson (45,46) schlugen für die Bestimmung der Catecholase-Aktivität die Sauerstoffaufnahme pro Stunde vor. Dabei macht sich aber die "Reaktionsinaktivierung" stark bemerkbar und erlaubt keine lineare Auswertung mehr. Dazu kommt, daß die verschiedenen Enzympräparationen nicht im gleichen Maße inaktiviert werden (47). Daher schlugen Keilin und Mann (4), sowie Gregg und Nelson (34) vor, nur die Sauerstoffaufnahme in den ersten zwei bis drei Minuten zu messen und definierten als Catecholase-Einheit diejenige Enzymmenge, die unter optimalen Bedingungen einen Sauerstoffverbrauch von 1omm^3/min bewirkt. Es bleibt jedoch der Nachteil, daß der Sauerstoffverbrauch, obwohl nach Gleichung I nur ein Mol für zwei Mol Brenzcatechin verbraucht werden dürfte, durch die eintretenden Sekundärreaktionen zu hoch ist (32,48). Beim Einsatz anderer Brenzcatechinderivate ist er von Fall zu Fall verschieden (31).

Zur Bestimmung der Cresolase-Aktivität zogen Graubard und Nelson ebenfalls die O_2-Aufnahme in mm^3/

min heran (45,46). Auch diese Methode hat den Nachteil, daß die entstehenden o-Diphenole sogleich zu den korrespondierenden o-Chinonen oxydiert werden, die zu unkontrollierbaren Sekundärreaktionen führen. Daher wird die Sauerstoffaufnahme verfälscht und liefert keine genaue Auskunft mehr über die tatsächlichen Vorgänge bei der Hydroxylierung.
1.4.3. Versuche, die Abnahme des Substrates zur Messung der Catecholase-Aktivität heranzuziehen, sind mir nicht bekannt. Dagegen wird zur Verfolgung der Cresolase-Aktivität beziehungsweise der Vorgänge bei der Hydroxylierung über die Messung der Abnahme des Substrates auf photometrischen (49) oder titrimetrischem Wege (50) berichtet. Gerade in den Anfangsminuten, in denen sich die für das Verständnis der Vorgänge bei der Hydroxylierung wichtigen Reaktionen unverfälscht abspielen, sind diese Meßmethoden aber besonders ungenau.
1.4.4. Die direkte Messung der Zunahme der Reaktionsprodukte zur Bestimmung der Catecholase-Aktivität wurde von Keilin und Mann eingeführt, als sie photometrisch die Bildung von Purpurogallin bei der Umsetzung von Pyrogallol maßen (4). Auch andere Autoren versuchten eine unspezifische, photometrische Auswertung der Reaktionsprodukte verschiedener Brenzcatechinderivate (51,52).
Zur Messung der Cresolase-Aktivität werden ebenfalls unspezifische, photometrische Methoden, be-

ruhend auf Messung der Sekundärreaktion von Phenoloxydase mit den entstehenden o-Diphenolen, herangezogen (14). Spezifisch ist jedoch die Messung des bei der Hydroxylierung von 3,5,-tritiummarkierten L-Tyrosin gebildeten ^{3}HOH (38), beziehungsweise der Hydroxylierungsprodukte von Tyrosin mit ^{18}O-markiertem Sauerstoff (2). Diese Methoden sind jedoch kostspielig und aufwendig und eine Kontrolle über etwaige Einflüsse der Sekundärreaktionen auf die Enzymaktivität schwierig.

1.4.5. Die indirekten Meßmethoden der Catecholase- beziehungsweise Cresolase-Aktivität nutzen die Tatsache, daß sich die primär oder sekundär bildenden o-Chinone auf zweierlei Weise nichtenzymkatalysiert umsetzen lassen.

Setzt man zum Reaktionsansatz Reduktionsmittel hinzu, so bilden sich aus den o-Chinonen wieder o-Diphenole, wobei das Reduktionsmittel oxydiert wird. Das gebildete Oxydationsprodukt (53), die Sauerstoffaufnahme (5,54), oder die Zeit, in der eine bestimmte Menge Reduktionsmittel, in der Regel Ascorbinsäure, umgesetzt wird, können ausgewertet werden. Diese letzte Methode nennt man Zeitmeßmethode (29,55). Hierbei kann insbesondere die Catecholase-Aktivität ziemlich unverfälscht beobachtet werden. Die Cresolase-Aktivität wird jedoch durch die Anhäufung des sich im Verlaufe der Reaktion bildenden o-Diphenols gestört.

Eine zweite Methode, die gebildeten o-Chinone abzufangen, ist der Zusatz verschiedener nukleophiler Reagentien. Dabei bilden sich Reaktionsprodukte nach dem allgemeinen Schema der Indanilinsynthese (56). Qualitative Untersuchungen zur Bestimmung der Phenoloxydase-Aktivität wurden mit Aminoantipyrin und 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon gemacht (57), quantitative Versuche nur mit 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon (58).

2. Problemstellung

Die Mehrzahl der Untersuchungsmethoden zur Aktivitätsbestimmung von Phenoloxydasen liefern Ergebnisse, die häufig nur schwierig oder gar nicht auszuwerten und zu vergleichen sind, weil die Meßergebnisse durch Sekundärreaktionen verfälscht werden. Es schien daher lohnend zu versuchen, die zuletzt aufgeführte Kondensationsreaktion der o-Chinone zu einer allgemeinen Untersuchungsmethode der Phenoloxydase-Aktivität auszubauen.
Dabei mußte zuerst ein geeignetes Kondensationsmittel, ausgehend von den Untersuchungen mit 3-Methylbenzthiazolon-(2)-hydrazon, gefunden werden. Anschließend war zu prüfen, wie weit eine Anwendung auf die verschiedenen Problemstellungen möglich ist, welche zur Kenntnis der Phenoloxydasen wichtig sind.

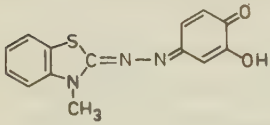
3. Theoretischer Teil

3.1. 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon als Kupplungsreagenz

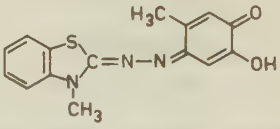
3.1.1. Um einen Überblick über die chemischen Vorgänge, die bei der Kupplungsreaktion auftreten, zu gewinnen, versuchte ich, aus Ansätzen mit äquimolaren Mengen 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon und Brenzcatechin, beziehungsweise Homobrenzcatechin, durch Inkubieren mit Phenoloxydase und Luftsauerstoff die entstehenden Farbstoffe zu isolieren. Das war ohne Schwierigkeiten möglich. Nachdem eine dünnschichtchromatische Untersuchung ergeben hatte, daß es sich um einheitliche Substanzen handelt, nur verunreinigt mit 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon, war gesichert, daß die Kupplungsreaktion eindeutig verlief.

Nach Hünig und Mitarbeitern (56) kuppeln Chinone mit 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon zu Azofarbstoffen. Diese besitzen ein niedrigeres Redoxpotential als die entsprechenden Phenole und werden daher sofort weiter zu den entsprechenden Azochinonen dehydriert. Bei den spektroskopischen Untersuchungen der von mir aus Brenzcatechin, beziehungsweise Homobrenzcatechin, hergestellten Farbstoffe ergab sich, daß hier noch eine Umlagerung zu den entsprechenden p-Benzochinon-azinen eintritt. Mit Brenzcatechin entstand [3-Methyl-benzthiazolon-(2)-] - [5-hydroxy-p-benzochinon]-azin **1** ,

mit Homobrenzcatechin [3-Methyl-benzthiazolon-(2)]-[5-hydroxy-2-methyl-p-benzochinon]-azin **2**.



1



2

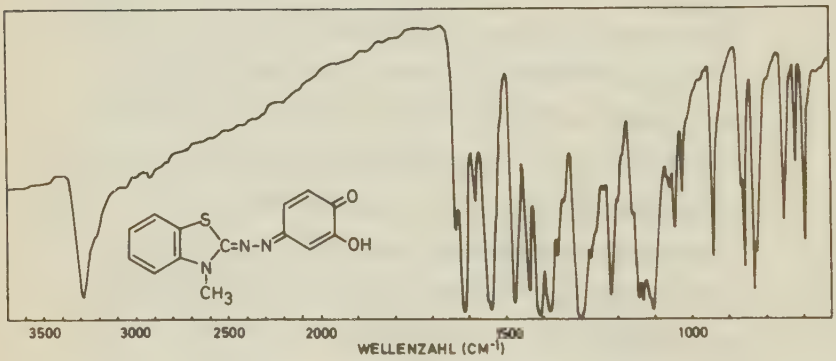


Abb. 1 IR-Spektrum von **1**

Das IR-Spektrum von **1** zeigt bei 3270 cm^{-1} eine Bande, die nur einer chelatisierten OH-Gruppe zugeordnet werden kann. Noch ausgeprägter ist die vergleichbare Bande im Spektrum von **2** bei 3300 cm^{-1} zu sehen. Da die Chelatisierung mit der Carbonylschwingung des Chinons erfolgt, sollte diese nach niedrigeren Wellenzahlen verschoben sein. Tat-

sächlich findet man die Carbonylschwingung von **1** bei 1600 cm^{-1} und die von **2** bei 1605 cm^{-1}. Bei dem zum Vergleich synthetisierten, OH-gruppenfreien [3-Methyl-benzthiazolon-(2)-]-[p-benzochinon]-azin (56) liegt sie dagegen bei 1632 cm^{-1}.

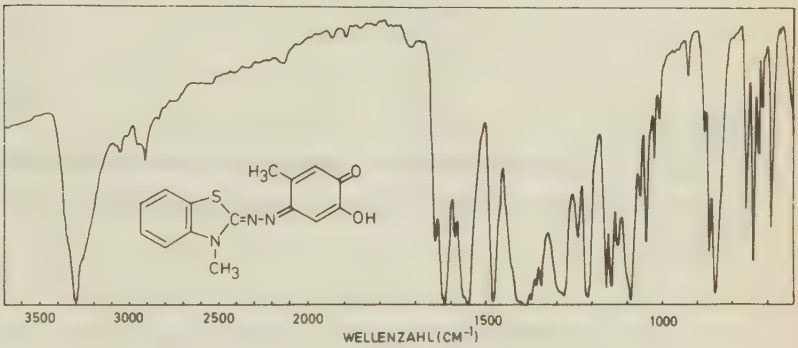


Abb. 2 IR-Spektrum von **2**

Das NMR-Spektrum von **1** zeigt bei 4,55 ppm den N-Methylpeak, dessen Integral die Deutung der übrigen Peaks erleichtert. Danach sind die beiden Peaks bei 7,12 und 7,27 ppm einem ortho-gekoppeltem Proton zuzuordnen. Da man im NMR-Spektrum des in 2-Stellung methylierten Produktes **2** bei 6,98 ppm nur noch ein ungekoppeltes Proton findet, müssen diese Peaks zu den Protonen in 3-Stellung gehören. Im Spektrum von **2** wird durch den Einfluß der Methylgruppe in 2-Stellung das Signal des Protons am Kohlenstoff 6 nach höherem Feld verschoben und

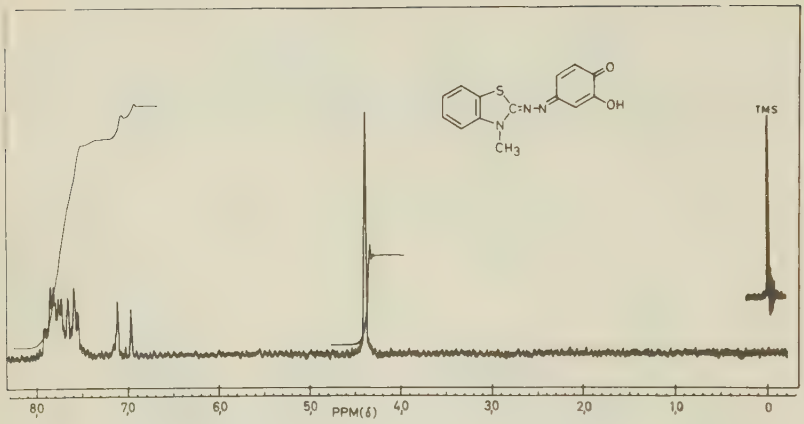


Abb. 3 NMR-Spektrum von **1** (CF_3COOD, Offset 1o Hz)

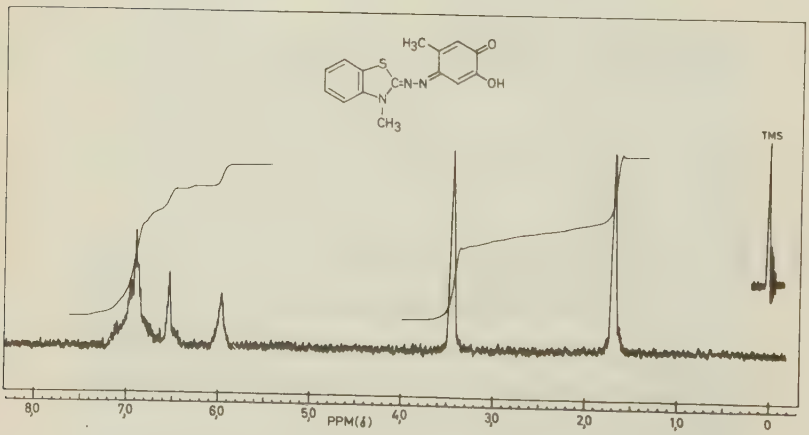


Abb. 4 NMR-Spektrum von **2** (CF_3COOD, Offset 6o Hz)

tritt bei 7,53 ppm auf. Solche Verschiebungen nach höherem Feld gegenüber den aromatischen Protonen sind für chinoide Systeme charakteristisch. Die Signale der Protonen an den OH-Gruppen sind in CF_3COOD nicht sichtbar, in den Spektren der sulfonierten p-Benzochinon-azinen, die in deuteriertem DMSO aufgenommen werden konnten, sind sie jedoch nachweisbar (Abb. 9, S. 27).

Die Extinktionen der Hauptmaxima der UV-Spektren von **1** und **2** verhalten sich nach den Gesetzen von Lambert und Beer. Hierauf kann also eine Gehaltsbestimmung einfach aufgebaut werden. Gleichzeitig ermöglicht das Vermessen der UV-Spektren der aus den Ansätzen mit Phenoloxydase, Brenzcatechinen und 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon isolierten Farbstoffe die Kontrolle von Nebenreaktionen.

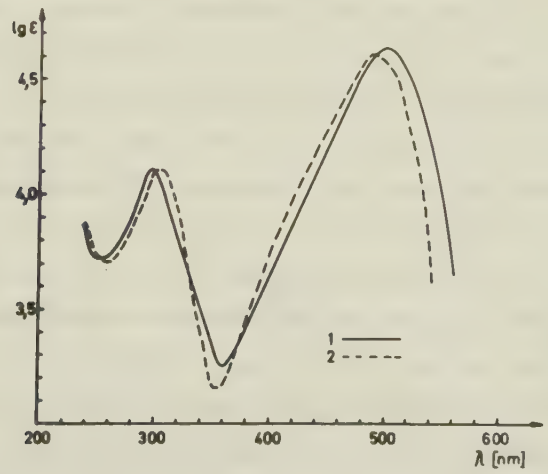
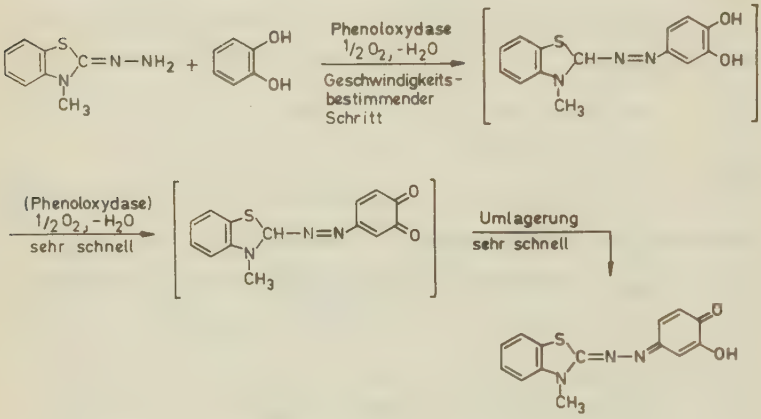


Abb. 5 UV-Spektren von **1** und **2** in $CHCl_3$

Aus den Untersuchungen an den isolierten Farbstoffen und der Tatsache, daß keine Nebenreaktionen beobachtet werden konnten, ergab sich folgender Reaktionsablauf bei Messung der Catecholase-Aktivität:



Gleichung V

Bei der Messung der Cresolase-Aktivität kommt als geschwindigkeitsbestimmender Schritt die Hydroxylierung des Monophenols dazu. Das kann deshalb mit Sicherheit gesagt werden, weil die Cresolase-Aktivität höchstens ein Viertel der Catecholase-Aktivität betragen kann.

3.1.2. Obwohl die Reaktion prinzipiell geeignet erscheint, eine allgemeine Bestimmungsmethode der Phenolase-Aktivität darauf aufzubauen, scheiterte dieser Versuch an praktischen Schwierigkeiten. Auf Grund der Schwerlöslichkeit des 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazons und der sich bildenden Farb-

stoffe in Wasser war es notwendig, wie es schon Voigt und Noske (58) getan hatten, die Ansätze während der Reaktion mit Chloroform zu unterschichten. In Chloroform lösten sich beide Komponenten in ausreichender Menge. Das bedeutete aber, daß jeder Ansatz einzeln aufgearbeitet werden mußte und das Verfahren deswegen ebenso aufwendig wurde, wie die Meßmethode in der Warburg-Apparatur, die üblicherweise zur Messung der Phenolase-Aktivität benützt wird. Gravierender ist aber die Ungenauigkeit, die der Methode anhaftet. Sie wird durch die folgenden Fakten verursacht: Das 3-Methylbenzthiazolon-(2)-hydrazon ist fast vollständig im Chloroform gelöst, während die Kondensationsreaktionen mit den gebildeten o-Chinonen in der wässrigen Phase ablaufen. Das geschieht nur gleichmäßig und schnell genug, wenn durch kräftige Luftzufuhr für eine gründliche Vermischung der beiden Phasen gesorgt wird. Die eingeleitete Luft wurde zwar mit Chloroform- und Wasserdampf gesättigt, um Verdunstung auszuschließen, aber der austretende Luftstrom bewirkte am Gaseinleitungsrohr unter den von Voigt und Noske gewählten Bedingungen einen derart beträchtlichen Düseneffekt, daß die Temperatur im Reaktionsgefäß in 2 - 3 Minuten von 25° auf 11°C absank. Dieser Verlust war auch durch Temperieren nicht auszugleichen. Der Aktivitätsverlust der Phenolase ist unter diesen Bedingungen zu

groß, als daß man ihn vernachlässigen könnte. Diese Schwierigkeiten schienen vermeidbar, wenn ein gut wasserlösliches Kupplungsreagenz eingesetzt werden würde.

3.2. 3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon als Kupplungsreagenz

3.2.1. Am einfachsten erschien es, in das 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon eine Sulfonsäuregruppe einzuführen, da die übrigen bei Hünig und Mitarbeitern beschriebenen Hydrazone auch nicht besser wasserlöslich sind. Bei der Einwirkung von 25%igem Oleum entstand eine Verbindung, deren Elementaranalyse ergab, daß tatsächlich eine Sulfonsäuregruppe in das Molekül eingetreten war. Das IR-

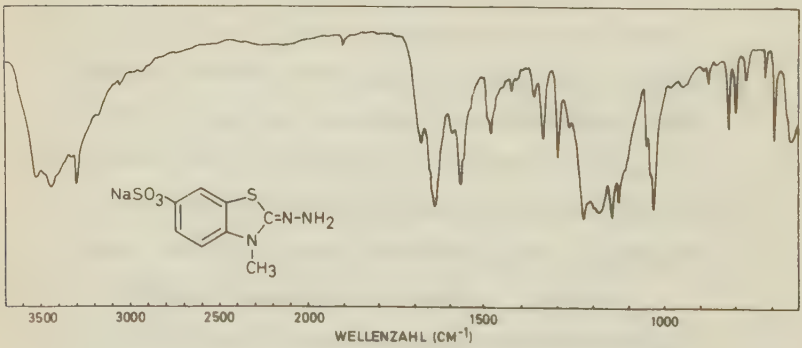


Abb. 6 IR-Spektrum von **3**

Spektrum von **3** untermauert diese Überlegung. Es zeigt im Bereich von 1230 - 1030 cm^{-1} die für Sul-

fonsäuregruppen typische Mehrfachbande. Im Fingerprintbereich liegen bei 875, 820 und 800 cm^{-1} drei schwache Banden, die den Protonen eines 1-,3-,4-substituierten Aromaten zugeordnet werden können. Dieses Substitutionsmuster kann im NMR-Spektrum von **3** gesichert werden. Es zeigt bei 7,35 ppm ein

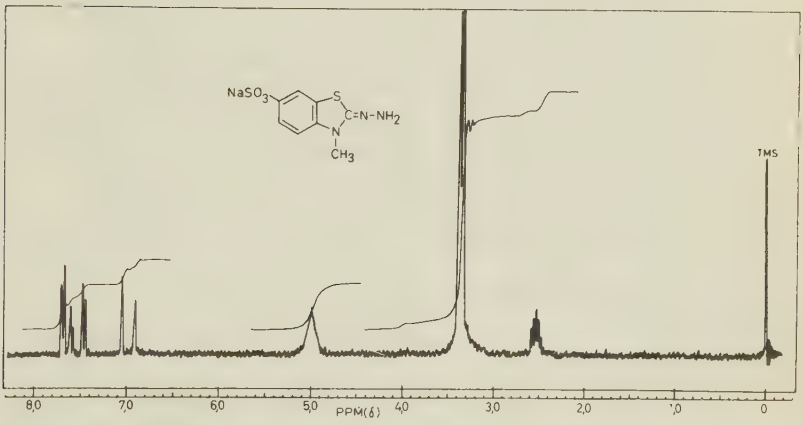
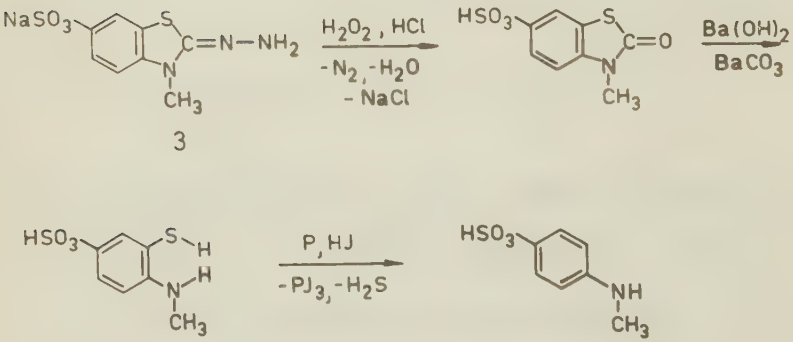


Abb. 7 NMR-Spektrum von **3** ($DMSO_{d6}$)

Aromatenmultiplett, dessen Integral drei Protonen anzeigt. Das Aufspaltungsmuster ist charakteristisch für zwei orthogekoppelte Protonen, deren eines mit einem weiteren Proton metagekoppelt ist. Das zeigt, daß die Sulfonsäuregruppe in der 5- oder 6-Stellung des 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon eingetreten sein muß. Das mit D_2O austauschbare Singulett

bei 5,oo ppm gehört zu den Protonen der Hydrazongruppe und das bei 3,33 ppm zu denen der N-Methylgruppe. Die übrigen Peaks (Multiplett bei 2,55 ppm, Singuletts bei 2,72, 3,36 und 4,o1) gehören zum DMSO und H_2O.

Um die Stellung der Sulfonsäuregruppe endgültig festzulegen, wurde die Hydrazongruppe von **3** mit H_2O_2 in HCl conc. in die Ketogruppe überführt und diese Substanz nach dem Verfahren von B. Rassow, W. Döhle und E. Reim abgebaut (Gleichung VI)(59). Als Endprodukt fand ich 4-N-Methylsulfanilsäure. Damit war bewiesen, daß bei der Sulfonierung von 3-Methylbenzthiazolon-(2)-hydrazon unter den gewählten Bedingungen 3-Methyl-6-sulfonyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon entsteht.



Gleichung VI

3.2.2. Das Natriumsalz des 3-Methyl-6-sulfonyl-benzthiazolon-(2)-hydrazons (Abkzg.: SMBH) erwies sich als geeignetes Kupplungsreagenz gegenüber Brenzcatechin und Homobrenzcatechin. Da jedoch die Catecholase-Aktivität der Phenoloxydase gegenüber verschiedenen Brenzcatechinderivaten bestimmt werden sollte, mußten noch weitere Kupplungsprodukte aus Ansätzen mit Brenzcatechinen, SMBH und Phenoloxydasen untersucht werden. Insgesamt wurden acht o-Diphenole eingesetzt, von denen fünf die für diese Arbeit interessante Kupplungsreaktion nach Gleichung V eingingen. Folgende Produkte konnten aus den verschiedenen Ansätzen isoliert werden:

a) Mit Homobrenzcatechin und SMBH entstand [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)]-[4-methyl-5-hydroxy-p-benzochinon]-azin **4** .

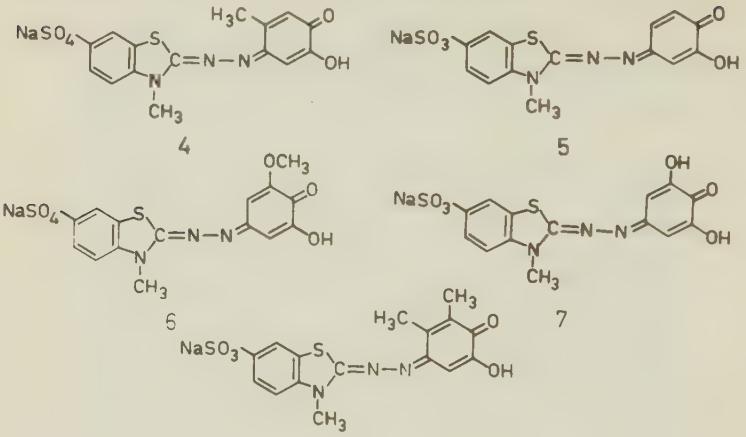
b) Mit Brenzcatechin und SMBH entstand [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)]-[5-hydroxy-p-benzochinon]-azin **5** .

c) Mit 3-Methoxybrenzcatechin und SMBH entstand [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)]-[3-methoxy-5-hydroxy-p-benzochinon]-azin **6** .

d) Mit Pyrogallol und SMBH entstand [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)]-[2,5-dihydroxy-p-benzochinon]-azin **7** .

e) Mit 3,4-Dimethyl-brenzcatechin und SMBH entstand [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)]-

[2,3-dimethyl-5-hydroxy-p-benzochinon]-azin **8** .



4 5 6 7 8

Die Strukturen wurden insbesondere durch IR- und NMR-Spektren nachgewiesen. Als Beispiel werden hier die Spektren von **4** aufgeführt.

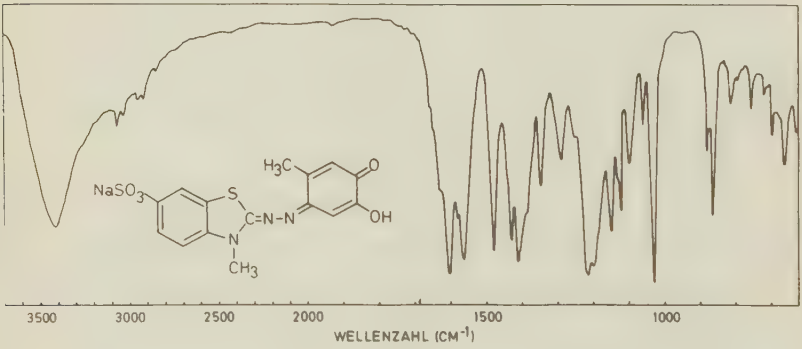


Abb. 8 IR-Spektrum von **4**

Das IR-Spektrum zeigt insbesondere eine OH-Bande

bei 3400 cm^{-1}, deren Verschiebung nach kleineren Wellenzahlen führ eine Chelatisierung spricht. Diese Chelatisierung erfolgt mit der benachbarten Carbonylfunktion des Chinons, deren Schwingung bei 1602 cm^{-1} liegt.

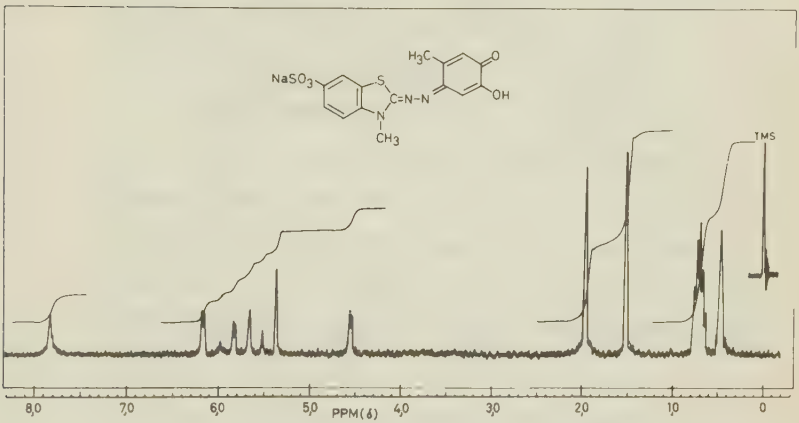


Abb. 9 NMR-Spektrum von **4** ($DMSO_{d6}$, Offset 110 Hz)

Im NMR-Spektrum von **4** findet man bei 9,77 ppm ein mit D_2O austauschendes Singulett, das dem Proton der OH-Gruppe zuzuordnen ist. Das Aromatenmultiplett mit dem Aufspaltungsmuster einer 1,2,4-Substitution liegt bei 7,69 ppm, während die Singuletts bei 7,20 ppm und 6,40 ppm zu den Protonen am Kohlenstoff 6 beziehungsweise 3 des chinoiden Systems gehören. Die Protonen der N-Methylgruppe

ergeben das Singulett bei 3,79 ppm und die der CH_3-Gruppe des chinoiden Systems das bei 2,3o ppm.

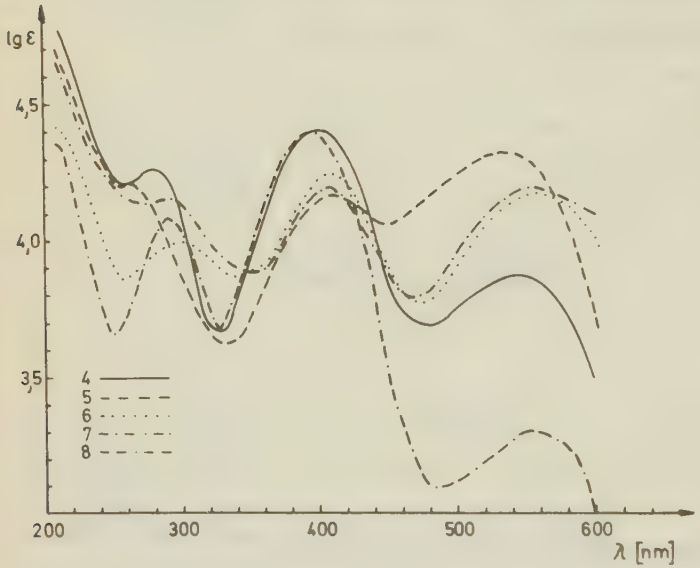


Abb. 1o UV-Spektren von **4** , **5** , **6** , **7** und **8** in H_2O 1o ml und H_3PO_4 85 % ad 5o ml

Die UV-Spektren von **4** , **5** , **6** , **7** und **8** wurden unter den Bedingungen aufgenommen, unter denen später ihre Gehaltsbestimmungen erfolgen sollten. Die Hauptmaxima verhalten sich nach den Gesetzen von Lambert und Beer und sind daher für quantitative Bestimmungen geeignet. Gleichzeitig wurde die Vermessung der UV-Spektren aus den Ansätzen von SMBH, Brenzcatechinen und Phenoloxydase zur Kontrolle von Nebenreaktionen benutzt. Es konnten keine Nebenreaktionen festgestellt werden.

Völlig anders verliefen die Umsetzungen mit SMBH,

Phenoloxydase und 3,4-Dihydroxy-acetophenon, 3,4-Dihydroxy-benzoesäure und 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon. Die Vermessung der UV-Spektren dieser Ansätze in 7o %igem Methanol ergab jedesmal die gleiche Absorptionskurve. Setzte man SMBH mit den drei Brenzcatechinen und Tetrachlor-o-chinon in 5o %igem Methanol um, so wurde auch hier immer die gleiche Substanz isoliert, deren UV-Spektrum mit dem aus den Enzymansätzen gewonnenen übereinstimmte. Auch IR- und NMR-Spektren stimmten überein. Es gelang nicht, die Struktur dieser Substanz aufzuklären. Jedoch zeigte das NMR-Spektrum, daß die Brenzcatechine nicht an der Reaktion teilgenommen haben, sondern eine Oxydation von SMBH allein stattgefunden haben muß. Das wird durch die Tatsache bestätigt, daß die Substanz auch entsteht, wenn SMBH allein mit Tetrachlor-o-chinon umgesetzt wird.
Die Bildung der Substanz in den Enzymansätzen muß dann wie folgt erklärt werden: Die durch das Enzym gebildeten o-Chinone von 3,4-Dihydroxy-acetophenon, 3,4-Dihydroxy-benzoesäure und 4-Pyrgallyl-phenyl-sulfon vermögen nicht mit SMBH zu kuppeln, statt dessen oxydieren sie SMBH zu einem blauen Farbstoff, wobei sie selbst wieder zu Diphenolen reduziert werden. Die Extiktion des Farbstoffes kann bei 528 nm gemessen werden und erlaubt eine qualitative Bestimmung der Enzymaktivität. Die Vorgänge entsprechen denen der Zeitmeßmethode (29,

55). Eine quantitative Auswertung der Reaktion ließ sich durchführen, indem SMBH unter den Reaktionsbedingungen der Aktivitätsbestimmung der Catecholase-Aktivität mit bekannten Mengen Tetrachlor-o-chinon umgesetzt wurde.

3.3. Allgemeine Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Catecholase- und der Cresolase-Aktivität

3.3.1. Die Umsetzung von Brenzcatechinen mit Phenoloxydase in Gegenwart von SMBH erlaubt die direkte Messung der Substratumsatzes (SU) pro Minute. Um Phenolasen unterschiedlicher Herkunft vergleichen zu können, legte ich geeignete Standardbedingungen fest, unter denen die Enzymeinheiten E jeweils bestimmt wurden:

Standardansatz I

Lösung A

Brenzcatechin	$0{,}5 \cdot 10^{-3}$ Mol	
SMBH	$0{,}5 \cdot 10^{-3}$ Mol	
Mac-Ilvain-Puffer pH 6,8		10 ml

Lösung B

Enzymlösung	10 ml

Lösung A wurde in einem 100 ml Zweihalsspitzkolben im Ultrathermostaten auf 25° C temperiert. Eine Minute vor Beginn der Messung begaste ich die Lösung durch ein geeignetes Gaseinleitungsrohr aus einer Druckluftflasche mit ca 400 - 600 ml Luft

pro Minute, die ich wasserdampfsättigte und auf 25° C brachte. Der Luftstrom wurde über die gesamte Versuchsdauer aufrecht erhalten.

Die Stoppuhr zum Versuchsbeginn wurde in dem Moment gestartet, in dem ich begann, Lösung B mit einer auf Ausblasen geeichten 1o ml Meßpipette in Lösung A einzublasen. Lösung B und die benutzte Pipette waren ebenfalls auf 25° C temperiert. 5o Sekunden nach Versuchsbeginn entnahm ich dem Ansatz 2,oo ml mit einer auf Ausblasen geeichten, 25° C warmen Meßpipette, die ich nach genau 6o Sekunden in ein Meßglas mit 8,2o ml H_3PO_4 85 % einzublasen begann. Nach dem vorsichtigen Mischen erhielt man 1o,oo ml Flüssigkeit, deren Extinktion bei 532 nm gegen eine Mischung von 2,oo ml H_2O und 8,2o ml H_3PO_4 85 % gemessen wurde. Unter gleichen Bedingungen wurde ein Blindwert erstellt, indem man Lösung B durch 1o,oo ml der gleichen Enzymlösung ersetzte, die durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf dem Wasserbad inaktiviert worden war.

Die Catecholase-Aktivität E_{Cat} berechnete sich dann wie folgt:

E_{Cat} = SU/min·ml = Farbstoffkonzentration (c) [mikroMol/min·ml]

$$c = \frac{E_{(Haupt)} - E_{(Blind)}}{\epsilon \cdot d} \cdot 5000 \text{ [mikroMol/min·ml]}$$

Bei dieser Methode wird die Reaktionsinaktivierung

außer Acht gelassen. Der Vergleich verschiedener Phenoloxydasen wird dadurch aber nicht beeinträchtigt.

Das Verhalten der Catecholase-Aktivität über die Zeit ließ sich ohne weiteres bestimmen, indem man dem inkubierten Ansatz in den gewünschten Zeitabständen weitere 2,00 ml entnahm und wie oben angegeben verarbeitete. So konnten aus einem Ansatz insgesamt neun Werte gewonnen werden. Die Blindwerte waren entsprechend zu erstellen.

Die hier beschriebenen Standardbedingungen wurden in sämtlichen Versuchen eingehalten. Wenn Zusätze zum Standardansatz I gemacht wurden, so wurden sie in Lösung A gelöst. Die Mengenangaben dieser Zusätze beziehen sich immer auf den fertigen Standardansatz I.

3.3.2. Die Cresolase-Aktivität der Phenoloxydase ließ sich ebenfalls direkt messen, da auf ein Mol eingesetzten Monophenol ein Mol o-Chinon entsteht, das mit SMBH kuppelt und ein Mol Farbstoff liefert. In meinen Versuchen setzte ich ausschließlich p-Kresol als Substrat ein. Die Standardbedingungen legte ich wie folgt fest:

Standardansatz II

Lösung A

p-Kresol	$0{,}5 \cdot 10^{-3}$ Mol
Homobrenzcatechin	$0{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mol
SMBH	$0{,}5 \cdot 10^{-3}$ Mol

Mac-Ilvain-Puffer pH 6,8 1o ml

Lösung B

Enzymlösung 1o ml

Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie bei der Bestimmung der Catecholase-Aktivität. Die Extinktion wurde bei 4o2 nm gemessen. Allerdings erfolgte die Berechnung der Cresolase-Aktivität aus den Messungen über die Zeit, wobei ich den linearen Bereich der Kurve zugrunde legte. Um diesen Bereich sicher zu erreichen, muß die Konzentration einer low-cresolase-Präparation so gewählt werden, daß der Substratumsatz/min bis zum Erreichen eines linearen Kurvenverlaufes abnimmt, dagegen muß er bei einer high-cresolase bis zum linearen Verlauf der Kurve zunehmen.

Die Cresolase-Aktivität E_{Cres} berechnete sich dann wie folgt:

E_{Cres} = SU/min·ml = Farbstoffkonzentration (c) [mikroMol/min·ml]

$$c = \frac{E_{(H)ymin} - E_{(B)ymin} - E_{(H)(y-1)min} + E_{(B)(y-1)min}}{\varepsilon \cdot d} \cdot 5000 \ [\text{mikroMol/min·ml}]$$

Auch diese Standardbedingungen wurden bei allen Versuchen eingehalten. Für Zusätze gilt Entsprechendes wie bei der Bestimmung der Catecholase-Aktivität.

3.3.3. Bei der technischen Durchführung der Versuche mußten einige Dinge beachtet werden, um möglichst gut reproduzierbare Werte zu erhalten:

a. Die Lösungen von SMBH mit Diphenolen zeigen teilweise eine beträchtliche Autoxydation. Daher wurde das SMBH unter Stickstoff gelöst und gegebenenfalls mit 1 N Natronlauge oder 1 N H_3PO_4 auf pH 6,8 gebracht. Diese Lösung ist unter Stickstoff einige Tage haltbar. Kurz vor Versuchsbeginn löst man die entsprechende Menge Phenol in 1o,oo ml der Flüssigkeit, wobei man ebenfalls Stickstoff einleitet. Sind die zuzusetzenden Phenolmengen so gering, das man sie nicht mehr abwiegen kann, muß man eine Stammlösung machen, die ebenfalls mit Stickstoff sauerstofffrei gemacht wird. Von der Stammlösung werden o,1 ml direkt vor Versuchsbeginn zur Lösung A gebracht. Die Volumenzunahme kann bei 2o ml Gesamtvolumen in der Berechnung vernachlässigt werden.

b. Die Enzymlösungen werden, falls irgend angängig, aus gefriergetrocknetem Material frisch bereitet, wobei Berührung mit Metallspateln zu vermeiden ist. High-cresolase-Präparationen zeigen bereits nach 15 Minuten einen beträchtlichen Aktivitätsverlust.

c. Die Phenole werden, falls möglich, doppelt sublimiert, sonst mehrfach unter Zusatz von metallfreier Kohle umkristallisiert. Auch hier ist Be-

rührung mit Metallen strikt zu meiden.
d. Der Zweihalsspitzkolben muß genügend lang und schmal sein. Die eine Öffnung, in die das Gaseinleitungsrohr eingeführt wird, besitzt einen NS 14,5 Normalschliff. Die andere Öffnung muß so angebracht sein, daß eine 2 ml Meßpipette bis an den Grund des Kolbens eingeführt werden kann. An dieser Stelle des Kolbens ließ ich mir vom Glasbläser eine leichte Erweiterung anbringen, um mit der Pipette Flüssigkeit entnehmen zu können, ohne daß Luft aus dem Gaseinleitungsrohr eindrang.
e. Das Gaseinleitungsrohr muß so tief in den Kolben reichen, daß noch 2 ml Flüssigkeit begast werden können. Es wird mit einem NS 14,5 Normalschliff im Kolben festgesetzt. Die Spitze des Rohres ließ ich mir vom Glasbläser mit einer kleinen Hohlkugel verschließen, die in gleichen Abständen drei Löcher von 1 mm lichter Weite trug. Auf diese Weise erreichte ich auch bei geringen Luftmengen eine gleichmäßige Begasung des Ansatzes.
f. Die Wasserdampfsättigung und Temperierung der Druckluft wird erreicht, wenn man sie durch einen Liebigkühler in einen Dreihalskolben mit siedendem Wasser bringt, den sie durch einen zweiten Liebigkühler wieder verläßt. Die Kühlung stellt man so ein, daß die austretende Luft etwa 28° C hat. Indem man sie durch drei Waschflaschen mit auf 25° C temperiertem Wasser leitet, erreicht man sowohl

die genaue Temperatur als auch 1oo % relativer Feuchte. Das ist wegen der sonst zu befürchtenden Verdunstungskälte von besonderer Bedeutung. Ebenso muß die Luftmenge von 4oo - 6oo ml/min eingehalten werden, weil bei zu geringer Luftzufuhr die Durchmischung und Sättigung des Ansatzes gefährdet ist. Bei zu großer Luftzufuhr dagegen tritt am Gaseinleitungsrohr ein beträchtlicher Düseneffekt ein, der die Temperatur der Lösung senkt.

g. Die Zeiten vom Beginn der Inkubierung bis zum Einblasen von 2,oo ml Reaktionsflüssigkeit in 8,2o ml H_3PO_4 ist so berechnet, daß die 2,oo ml 1o Sekunden nicht begast werden. Aus Versuchen dazu ergab sich, daß die Reaktion ca 2o Sekunden auch dann in der gleichen Weise abläuft, wenn die Begasung für diese Zeit unterbrochen ist. Das ermöglicht bei der grafischen Auswertung der Messergebnisse über die Zeit eine Korrektur, falls die genaue Zeiteinhaltung vom Beginn der Inkubierung bis zum Beginn des Einblasens in H_3PO_4 nicht gelingt.

h. Bei genauer Einhaltung der genannten Bedingungen ist die Abweichung reproduzierter Werte nicht größer als 1 %. In dieser Größenordnung bewegen sich auch die maximalen Abweichungen vom idealen Kurvenverlauf.

i. Die Anwendungsbreite der Methode wird durch drei Faktoren begrenzt. Die Schwerlöslichkeit der freien Sufonsäure aus SMBH verbietet eine Lösung

mit einem kleineren pH als 6,5, so daß Messungen über die pH-Abhängigkeit eingeschränkt sind. Der Bereich läßt sich erweitern, wenn man eine wesentlich geringere SMBH-Konzentration wählt. Dabei nimmt, wie später noch gezeigt wird, die Reaktionsinaktivierung beträchtlich zu, was sich in vielen Fällen als nachteilig erweist.

Der Zusatz stark oxydierender oder reduzierender Substanzen (z.B. NaN_3, Ascorbinsäure, oder Reagenzien mit Sulfhydrylgruppen) führt zur Änderung der sonst stabilen Farbstofflösungen in der Phosphorsäure. Auch Stoffe, die sich in der Phosphorsäure nicht lösen, können nicht untersucht werden.

3.4. Untersuchungen zur Catecholase-Aktivität von Phenoloxydasen

3.4.1. Um zu prüfen, ob die gebildeten Farbstoffe

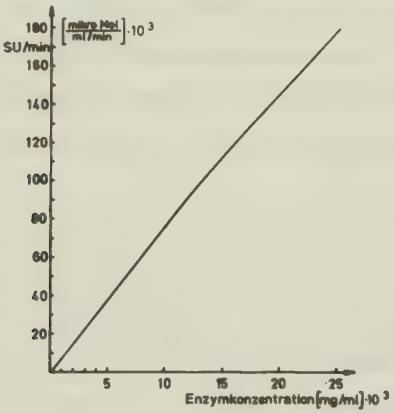


Abb. 11 Abhängigkeit des SU/min von der Enzymkonzentration im Standardansatz I. (Enzymaktivität = 6,48 E_{Cat}/mg)

einen Einfluß auf die Phenoloxydase ausüben, maß ich den Substratumsatz pro Minute in Abhängigkeit von der Enzymmenge. Der Substratumsatz ist, falls die Farbstoffe keinen Einfluß haben, praktisch proportional zur Enzymkonzentration. Tatsächlich zeigt Abb. 11 eine solche proportionale Abhängigkeit. Daher können Phenoloxydasen verschiedener Herkunft auch dann verglichen werden, wenn sie in unterschiedlichen Konzentrationen gemessen werden.

3.4.2. Weil sich die unterschiedlichsten o-Diphenole in Gegenwart von SMBH unter völlig gleichen Bedingungen umsetzen lassen, waren hier Ergebnisse zu erwarten, aus denen möglicherweise ein Zusammenhang zwischen Struktur der o-Diphenole und und ihrer Umsetzungsgeschwindigkeit mit Phenoloxydase zu ersehen war. Zur Berechnung werden die molaren Extinktionskoeffizienten der bei der Reaktion aus den verschiedenen o-Diphenolen mit SMBH gebildeten Farbstoffe benötigt, die in Tabelle 1 zusammengefaßt sind. Die Meßergebnisse sind in

Phenol	Farbstoff	λ max1 nm	λ max2 nm	ε1	ε2
Pyrogallol	7	551	406	15450	15840
3,4-Dimethylbrenzcatechin	8	550	396	2000	25010
3-Methoxybrenzcatechin	6	558	408	14590	17620

Homo-brenzcatechin	4	548	4o2	726o	2518o
Brenzcatechin	5	536	4o9	2o71o	1472o
5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon	?	528	-	Eine Extinktion von o,1 entspricht einem SU von 4o,5• $1o^{-3}$ mikroMol/ml, gemessen von 2 ml Standardansatz in 8,1 ml Methanol 9o%, 1 cm Küvette	
3,4-Dihydroxy-benzoesäure	?	528	-		
3,4-Dihydroxy-acetophenon	?	528	-		

Tab. 1 Molare Extinktionskoeffizienten der Kondensationsprodukte von o-Diphenolen mit SMBH und Phenoloxydasen

den Abb. 12 und 13 dargestellt. Es ist ohne weiteres zu erkennen, daß offensichtlich kein einfacher Zusammenhang zwischen Struktur der Diphenole und der Reaktionsgeschwindigkeit besteht. Ebenso ist ein Zusammenhang zwischen Reaktionsinaktivierung und Struktur nicht ohne weiteres festzustellen. Da die Phenoloxydase jedoch ein Kupferproteid ist und die Rolle des Kupfers für die Enzyminaktivierung bisher noch nicht weiter untersucht wurde, versuchte ich, einen Zusammenhang zwischen den Redoxpotentialen der eingesetzten o-Diphenole, der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit v_o und der Reaktionsinaktivierung festzustellen. Zu diesem Zweck mußten die Kurven der Abb. 12 und 13 grafisch ausgewertet werden. Das geschah, indem jede Kurve im für sie günstigsten Maßstab gezeichnet wurde.

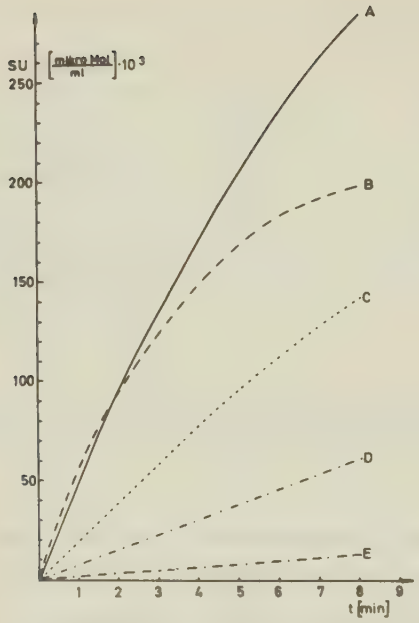


Abb. 12 Messung der Catecholase-Aktivität von Phenoloxydase gegenüber verschiedenen o-Diphenolen (o,oo8 mg Enzym/ml, Enzymaktivität = 6,48 E_{Cat}/mg). Standardansatz I ohne Brenzcatechin, stattdessen o,25 · $1o^{-4}$ Mol/ml
A Pyrogallol, B Brenzcatechin, C Homobrenzcatechin, D 3,4-Dimethyl-brenzcatechin
E 3-Methoxy-brenzcatechin

Aus der Steigung der Tangente im Nullpunkt der Kurve kann man direkt den SU/min am Reaktionsbeginn ablesen. Dividiert man ihn durch die eingesetzte Enzymmenge/ml, erhält man die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit v_o, gemessen in SU/min·mg Enzym. Auf gleiche Weise läßt sich auch die Reaktionsgeschwindigkeit nach acht Minuten ermitteln (v_8). Da man annehmen kann, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in

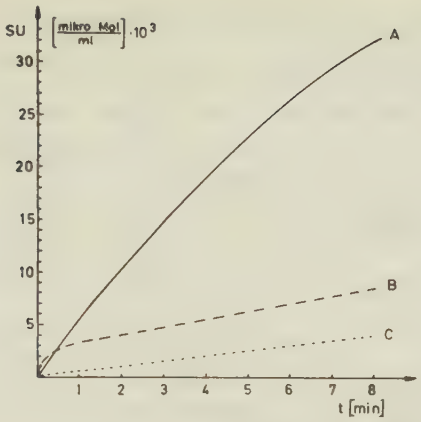


Abb. 13 Messung der Catecholase-Aktivität von Phenoloxydase gegenüber verschiedenen o-Diphenolen (o,oo8 mg Enzym/ml, Enzymaktivität = 6,48 E_{Cat}/mg). Standardansatz I ohne Brenzcatechin, stattdessen o,25·1o^{-4} Mol/ml A 3,4-Dihydroxy-benzoesäure, B 3,4-Dihydroxy-acetophenon, C 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon.
2,oo ml inkubierter Ansatz werden in 8,1o ml Methanol 9o % eingeblasen! Messung der Extinktion bei 528 nm in 1 cm Küvetten.

jedem Zeitpunkt gerade proportional zur noch aktiven Enzymmenge ist, ergibt sich eine einfache Berechnung der Reaktionsinaktivierung in acht Minuten, gemessen in SU/min·mg inaktiviertes Enzym, nach der Formel:

$$RI = \frac{SU_{8min} \cdot 8}{E - E \cdot v_8/v_o} \quad [\text{mikroMol/min} \cdot \text{mg}]$$

RI = Reaktionsinaktivierung, E = Enzymmenge [mg·ml]
Das Ergebnis drückt aus, wieviel mikroMol Substrat in einer Minute umgesetzt werden müssen, um ein mg

Enzym zu inaktivieren. Die grafische Auswertung solcher Kurven und die Berechnung der Reaktionsinaktivierung wurden schon von Asimov und Dawson (44) vorgeschlagen. Trägt man die Reaktionsinak-

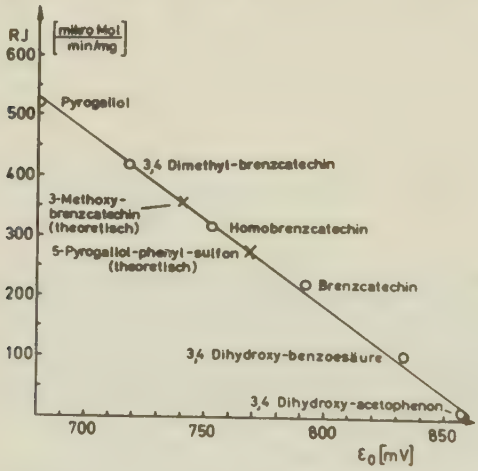


Abb. 14 Abhängigkeit der Reaktionsinaktivierung vom Redoxpotential der eingesetzten o-Diphenole

tivierung in Abhängigkeit vom Redoxpotential ε_o der eingesetzten o-Diphenole auf, erhält man eine Kurve, die zeigt, daß eine direkte Abhängigkeit besteht. Dabei können Werte der Reaktionsinaktivierung durch 3-Methoxy-brenzcatechin und 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon allerdings nicht berechnet werden, weil sie im Meßzeitraum keine meßbare Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit zeigen. Man kann der Kurve jedoch die theoretische RI entnehmen und daraus das Verhältnis v_o/v_s berechnen, wenn man den

SU_{8min} aus den Abb. 12, beziehungsweise 13, abliest. Dabei ergibt sich für 3-Methoxy-brenzcatechin ein v_8, das 96,6 % von v_o beträgt. Für 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon liegt dieser Wert bei 98,6 %. Solche geringen Abweichungen sind bei der grafischen Auswertung der Kurven nicht mehr zu fassen; die Linearität des SU von 3-Methoxybrenzcatechin und 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon sprechen daher nicht gegen die Richtigkeit der Kurve in Abb. 14. Extrapoliert man die Kurve in Richtung auf höhere Redoxpotentiale, so ergibt sich, daß o-Diphenole mit einem höheren Potential als ca 87o mV praktisch keine Aktivität gegenüber Phenoloxydase zeigen dürfen, weil sie eine zu starke Reaktionsinaktivierung bewirken. In Arbeiten von Horner und Geye , denen alle hier aufgeführten Redoxpotentiale von o-Diphenolen entnommen wurden (6o), konnte ich eine ganze Anzahl o-Diphenole, die bisher als Substrate der Phenoloxydase eingesetzt wurden, auf ihre Redoxpotentiale prüfen. Dabei ergab sich, daß, soweit die Potentiale überhaupt bekannt sind, kein o-Diphenol einen Umsatz mit Phenolase zeigt, dessen Potential über 87o mV liegt. Solche o-Diphenole sind z.B.: 4-Benzolsulfonyl-brenzcatechin (883 mV), 4-Nitrobrenzcatechin (891 mV), 3,5-Dinitro-brenzcatechin (ca 9oo mV) und Adrenalon (9o9 mV) (31). Auch hierdurch wird die Richtigkeit der Kurve in Abb. 14 indirekt bestätigt.

3.4.3. Eine Interpretation der Kurve in Abb. 14 kann sich auf die Tatsache stützen, daß das Kupfer in der Phenoloxydase nicht nur vor (9, 1o), sondern auch während der Reaktion in einwertiger Form vorliegt (1o, 16, 17). Die Reaktionsinaktivierung müßte dann auf eine irreversible Oxydation des Cu^{+} zum Cu^{2+} beruhen. Diese Oxydation müßte durch die gebildeten Chinone erfolgen und wäre sowohl von der Reaktionsgeschwindigkeit v (Erhöhung der Chinonkonzentration), als auch vom Redoxpotential der eingesetzten o-Diphenole (Erhöhung der Oxydationsgeschwindigkeit) abhängig.
Der Einfluß der Reaktionsgeschwindigkeit wurde bereits bei der Berechnung der Reaktionsinaktivierung (S. 41) berücksichtigt, so daß Abb. 14 die Richtigkeit der Überlegungen zur Reaktionsinaktivierung stützt.

3.4.4. Im Widerspruch zu der Erklärung der Reaktionsinaktivierung durch irreversible Oxydation des Cu^{+} zu Cu^{2+} steht allerdings die Untersuchung von Dawson und Tarphy, die fanden, daß ein Zusatz von o-Chinon zu einem Ansatz mit Brenzcatechin und Phenoloxydase die Reaktionsinaktivierung nicht erhöht (33). Sie hatten dabei aber keine Möglichkeit zu prüfen, ob nicht der intermediär bei der Reaktion auftretende Komplex aus Enzym und Chinon für die Inaktivierung verantwortlich ist. Diese Möglichlichkeit ist nun bei der Meßmethode mit SMBH vor-

handen, weil die Existenzdauer dieses Komplexes von der SMBH-Konzentration abhängig sein muß. Dazu wurde zunächst die Abhängigkeit der Catecholase-Aktivität von der SMBH-Konzentration gemessen (Abb. 15). Aus den Kurven wurden die Reaktionsgeschwin-

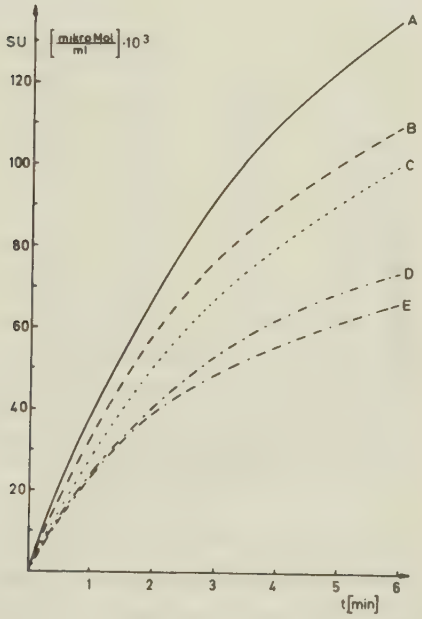


Abb. 15 Messung der Catecholase-Aktivität in Abhängigkeit von der SMBH-Konzentration (0,002 mg Enzym/ml, Enzymaktivität = 18,8 E_{Cat}/mg). Standardansatz I, jedoch SMBH-konzentration/ml gleich A $25 \cdot 10^{-6}$ Mol, B $12{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mol, C $5 \cdot 10^{-6}$ Mol, D 10^{-6} Mol, E $0{,}25 \cdot 10^{-6}$ Mol.

digkeiten v_0 und v_6 entnommen und die Reaktionsinaktivierung nach sechs Minuten berechnet. Die Er-

gebnisse sind in Abb. 16 zusammengefaßt. Sie zei-

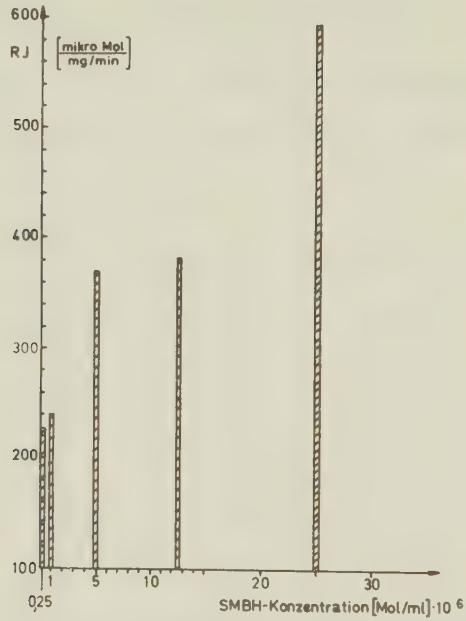


Abb. 16 Abhängigkeit der Reaktionsinaktivierung von der SMBH-Konzentration

gen, daß die Reaktionsinaktivierung in der Tat von der Konzentration des Enzym-Chinon-Komplexes abhängig ist, die wiederum von der Existenzdauer dieses Komplexes bestimmt wird. Diese wird umso kürzer, je mehr SMBH vorhanden ist, das mit den Chinon zum Farbstoff kuppelt. Damit ist der Widerspruch gegen die Theorie einer irreversiblen Oxydation von Cu^{+} zu Cu^{2+}, der sich aus den Ergebnissen von Dawson und Tarphy ergab, ausgeräumt.

3.4.5. Einen endgültigen Beweis für die Richtig-

keit meiner Theorie erhoffte ich durch das Verhalten der v_o, beziehungsweise der Reaktionsinaktivierung gegenüber Cu^{2+}-spezifischen Reagentien und gegenüber Cu^{2+}-Ionen zu erhalten. AeDTE bildet mit Cu^{+} nur relativ unbeständige Komplexe, mit Cu^{2+} dagegen sehr beständige. Es sollte daher ein schwacher, inkompetitiver Hemmer der Phenoloxydase sein und findet sich auch als solcher in der Literatur (61). Die Hemmwirkung drückt sich in der Erniedrigung der v_o aus. Das Verhalten gegenüber der Reaktionsinaktivierung wird durch die Fähigkeit bestimmt, die nach meiner Theorie gebildeten Cu^{2+}-Ionen komplex zu binden. Dadurch wird das Redoxpotential der im Enzym verbleibenden Cu^{+}-Ionen niedrig gehalten und der Angriff des Enzym-Chinon-Komplexes erleichtert. Die Reaktionsinaktivierung sollte also in Gegenwart von AeDTE verstärkt werden.

Cu^{2+}-Ionen müßten die Cu^{+}-Ionen des Enzyms teilweise verdrängen und daher auch zu einer Verminderung der v_o führen. Sie erhöhen aber das Redoxpotential der verbleibenden Cu^{+}-Ionen und sollten deswegen die Reaktionsinaktivierung abschwächen. In Abb. 17 wird das Verhalten von AeDTE gegenüber dem Standardansatz I dargestellt, während der Einfluß der Cu^{2+}-Ionen gegenüber einem Ansatz mit geringer SMBH-Konzentration geprüft wird, da SMBH selbst die Reaktionsinaktivierung schwächt. Aus

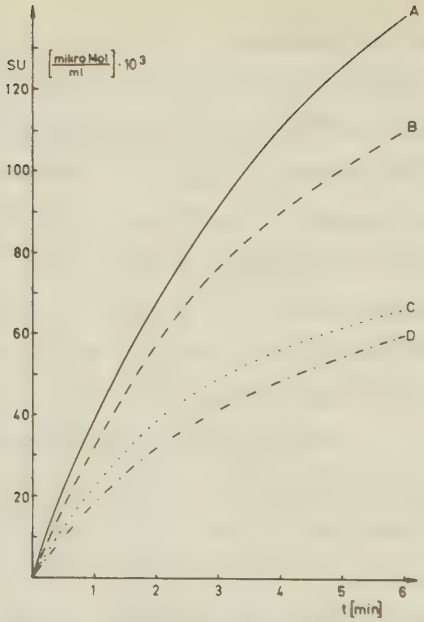


Abb. 17 Abhängigkeit der Catecholase-Aktivität vom Zusatz an AeDTE, bezw. Cu^{2+}. (o,oo2 mg Enzym/ml, Enzymaktivität = 18,8 E_{Cat}/mg) A Standardansatz I, B Standardansatz I mit $1{,}25 \cdot 10^{-4}$ Mol AeDTE/ml (mit 4 N NaOH auf pH 6,8 gebracht!), C Standardansatz I, jedoch $0{,}25 \cdot 10^{-6}$ Mol SMBH/ml, D wie C, jedoch das Enzym in $3 \cdot 10^{-7}$ M Kupferacetatlösung gelöst.

den Kurven wurde, wie üblich, grafisch v_o und v_6 bestimmt und die Reaktionsinaktivierung berechnet. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2. Sie entsprechen völlig den Voraussagen und beweisen meiner Ansicht nach nicht nur, daß das Kupfer im Enzym während der Reaktion im einwertigen Zustand vorliegt, sondern auch, daß die Reaktionsinaktivierung durch eine irreversible Oxydation des Cu^{+} zum Cu^{2+} zustande

Ansatz	v_o [mikroMol/mg·min]	RI [mikroMol/min·mg]
Standardansatz I	22,5	592
Standardansatz I + 1,25 ·1o^{-3} Mol AeDTE/ml	19,75	4o6
Standardansatz I, jedoch o,25 ·1o^{-6} Mol SMBH /ml	17,5	226
wie vorstehend, jedoch Enzym gelöst in 3· 1o-7 M Kupferacetatlösung	9,75	28o

Tab. 2 Einfluß von AeDTE, bezw. Cu^{2+} auf die Reaktionsinaktivierung und die v_o.

kommt.

3.4.6. Abbildung 16 zeigt, daß zwischen SMBH-Kon-

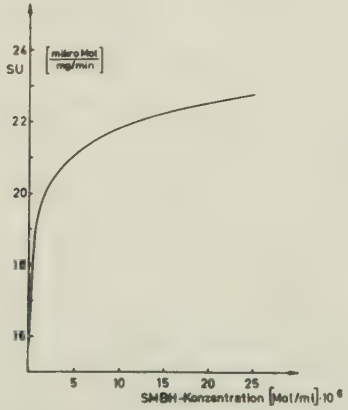


Abb. 18 Abhängigkeit der v_o von der SMBH-Konzentration

zentration und der Reaktionsinaktivierung kein einfacher Zusammenhang besteht. Im mittleren Konzentrationsbereich ist der Einfluß der Konzentration gering, während er bei hohen und niedrigen Konzentrationen groß ist. Dieses Verhalten muß im Zusammenhang mit der Kurve in Abbildung 18, die die Abhängigkeit der v_o von der SMBH-Konzentration zeigt, diskutiert werden. Der steile Anstieg der v_o bei geringen SMBH-Konzentrationen ergibt sich aus der schnellen Freisetzung des Enzyms aus dem Enzym-Chinon-Komplex durch den Angriff des SMBH. Bei hohen SMBH-Konzentrationen wird die v_o praktisch kaum noch verändert. Wenn hier dennoch eine Verringerung der Reaktionsinaktivierung durch SMBH stattfindet, so zeigt das, daß bei der Umsetzung von Brenzcatechin mit Phenoloxydase Enzym aus einem Enzym-Chinon-Komplex freigesetzt werden kann, ohne die Reaktionsgeschwindigkeit zu beeinflussen. Das bedeutet, daß während der Reaktion zwei verschiedene Enzym-Substrat-O_2-Komplexe auftreten müssen. Die Bildung eines dieser Komplexe bestimmt die Gesamtgeschwindigkeit der Reaktion. Meines Wissens sind diese Ergebnisse die ersten, die direkt eine solche "Zwei Schritt - Vier Elektronenreduktion" des O_2 stützen, wie sie von Hamilton (19) vorgeschlagen wurde (Gleichung III, S. 4).

3.4.7. Weitere Erkenntnisse zum Reaktionsmechanismus der Oxydation von o-Diphenolen durch Phenoloxy-

dase ergaben sich aus den Untersuchungen zur Cresolase-Aktivität, die daher als nächste aufgeführt werden.

3.5. Untersuchungen zur Cresolase-Aktivität von Phenoloxydasen

3.5.1. Während die Catecholase-Aktivität der Phenoloxydasen pflanzlicher Herkunft keine prinzipiellen Unterschiede erkennen läßt, ist ein Hauptmerkmal der Cresolase-Aktivität, daß das Verhältnis zur Catecholase-Aktivität variabel sein kann.

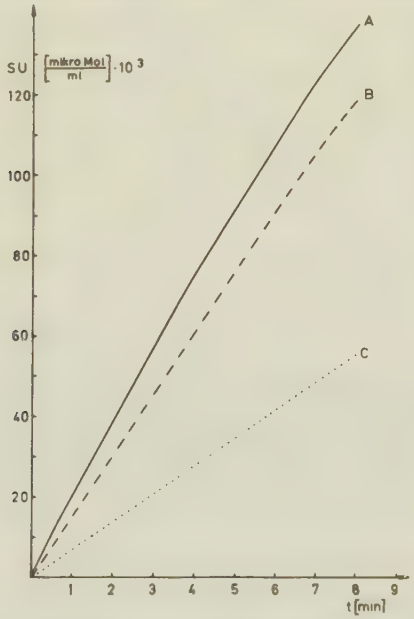


Abb.19 Abhängigkeit der Cresolase-Aktivität einer low-cresolase-Präparation vom Zusatz verschiedener Mengen Homobrenzcatechin (o,12 mg Enzym/ml, Enzymaktivität/mg E_{Cat}/E_{Cres} = 15,7/ o,116) Standardansatz II, jedoch Homobrenzcatechin in Mol/ml A $2,5 \cdot 10^{-8}$, B $1,25 \cdot 10^{-8}$, C $0,125 \cdot 10^{-8}$.

Daher prüfte ich zunächst, ob sich im Verhalten gegenüber einem Zusatz an Homobrenzcatechin, der die Induktionszeit verkürzt, ein Unterschied zwischen low-cresolase- und high-cresolase-Präparationen feststellen läßt (Abb. 19 und 2o). Homobrenzcate-

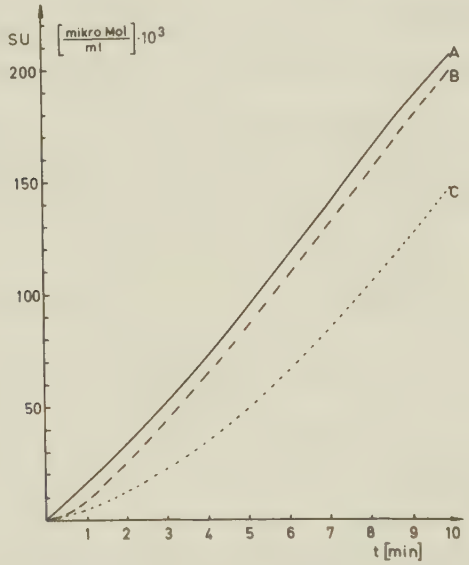


Abb. 2o Abhängigkeit der Cresolase-Aktivität einer high-cresolase-Präparation vom Zusatz verschiedener Mengen Homobrenzcatechin (o,o1 mg Enzym/ml, Enzymaktivität/mg E_{Cat}/E_{Cres} = 18,8/2,5). Standardansatz II, jedoch Homobrenzcatechin in Mol/ml A $2{,}5 \cdot 1o^{-8}$, B $1{,}25 \cdot 1o^{-8}$, C $o{,}125 \cdot 1o^{-8}$.

chin soll ja, wie viele o-Diphenole, eine katalytische Wirkung auf die Cresolase-Aktivität ausüben (21,22). Man kann aus Abb. 19 entnehmen, daß ein Überschuß an Homobrenzcatechin von der Catechola-

se-Aktivität einer low-cresolase-Präparation abgebaut wird, bis eine optimale Konzentration erreicht wird, in der die Cresolase-Aktivität konstant ist (Kurve A). Wird diese optimale Konzentration von Anfang an erreicht, verläuft die Reaktion über die ganze Meßzeit konstant und zwar in der gleichen Geschwindigkeit wie im optimalen Teil der Kurve A (Kurve B). Entsprechend geringere Zusätze an Homobrenzcatechin bewirken auch einen linearen Anstieg des Substratumsatzes, ergeben aber nicht die optimale Reaktionsgeschwindigkeit (Kurve C). Genau hier aber liegt der Unterschied zum Verhalten der Cresolase-Aktivität einer high-cresolase-Präparation. Hier bewirkt der Zusatz von Homobrenzcatechin, der nicht zum Erreichen der optimalen Reaktionsgeschwindigkeit ausreicht, zwar auch, je nach der Menge, eine unterschiedliche Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, die Geschwindigkeit steigert sich aber im Verlauf der Reaktion so lange, bis in jedem Falle der gleiche, optimale Umsatz erreicht wird (Abb. 2o, Kurve A, B und C).
Da man nicht annehmen kann, daß die Reaktionskatalyse, die Homobrenzcatechin in low-Cresolase-Präparationen bewirkt, anderer Natur ist als die in high-cresolase-Präparationen, konnte eine Deutung dieses unterschiedlichen Verhaltens nur dann erhofft werden, wenn es gelang, nähere Angaben über die Art der Reaktionskatalyse, die Homobrenzcate-

chin gegenüber der Cresolase-Aktivität bewirkt, zu gewinnen.

3.5.2. Am wichtigsten schien mir dabei die Frage, ob die Catecholase-Aktivität der Phenoloxydase gegenüber Homobrenzcatechin einen Einfluß auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit hat, weil dadurch festgestellt werden kann, ob das o-Diphenol direkt am Enzym angreift und selbst während der Reaktion dehydriert wird. Das hoffte ich festzustellen, indem ich dem Standartansatz II verschiedene o-Diphenole zusetzte, deren Aktivität gegenüber Phenoloxydase ich schon gemessen hatte. Sie ergab sich zunächst aus den Reaktionsgeschwindigkeiten v_o, die ich aus Abb. 12 und 13 entnommen hatte. Die v_o der eingesetzten o-Diphenole sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Messung der Cresolase-Ak-

o-Diphenol	v_o [mikroMol/mg·min]
Homobrenzcatechin	27,5
3,4-Dimethyl- brenzcatechin	9,42
3- Methoxy- brenzcatechin	1,96
3,4-Dihydroxy-benzoesäure	7,5
5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon	1,22
3,4-Dihydroxy-acetophenon	17,0
Pyrogallol	62,5
Brenzcatechin	75,0

Tab. 3 v_o verschiedener o-Diphenole

tivität erfolgte mit einer high-cresolase-Präparation und ist in Abbildung 21 dargestellt. Es zeig-

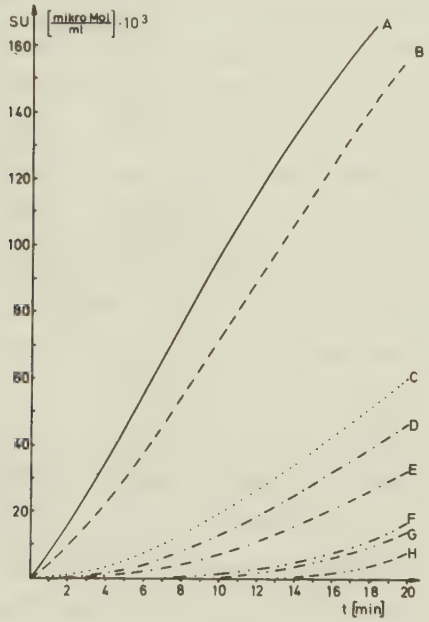


Abb. 21 Abhängigkeit der Cresolase-Aktivität einer high-cresolase-Präparation vom Zusatz verschiedener o-Diphenole (0,005 mg Enzym/ml, Enzymaktivität/mg E_{Cat}/E_{Cres} = 18,8/2,5). Standardansatz II, jedoch anstatt Homobrenzcatechin $2{,}5 \cdot 10^{-8}$ Mol/ml folgender o-Diphenole: A Homobrenzcatechin, B Brenzcatechin, C Pyrogallol, D 3,4-Dihydroxy-acetophenon, E 3,4-Dimethyl-brenzcatechin, F 3,4-Dihydroxy-benzoesäure, G 3-Methoxy-brenzcatechin, H 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon.

te sich, daß die eingesetzten o-Diphenole die Induktionsperiode umso schneller verkürzten, je größer ihr v_o gegenüber der Catecholase-Aktivität war. Nur Homobrenzcatechin hatte eine wesentlich stär-

kere Wirkung - die stärkste aller eingesetzten o-Diphenole - als es seiner v_o entsprach.

3.5.3. Die v_o ist aber nicht das eigentliche Maß für die Affinität, die ein o-Diphenol zur Phenoloxydase besitzt. Besser ist es, die Fähigkeit zur Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes zu messen. Das läßt sich durchführen, indem man den Substratumsatz mit Catecholase in Gegenwart zweier o-Diphenole untersucht. Hier boten sich Brenzcatechin, weil es die größte v_o besitzt, und Homobrenzcatechin, weil es die Cresolase-Aktivität am besten katalysiert, zur Prüfung an. Die Konzentration wurde so gewählt, daß sie möglichst nahe an die Menge herankommt, die zur Katalyse der Cresolase-Aktivität eingesetzt wurde. Die Berechnung des Umsatzes beider Substrate nebeneinander wird durch die unterschiedliche Absorption der gebildeten Farbstoffe bei verschiedenen Wellenlängen ermöglicht. Man mißt die Extinktionen im Falle von Brenzcatechin und Homobrenzcatechin bei 536 und 4o2 nm und berechnet die jeweils umgesetzte Menge nach den Formeln:

$$E_{B4o2} = \frac{3{,}48 \cdot gE_{536} - gE_{4o2}}{2{,}48}$$ und

$$E_{H4o2} = gE_{4o2} - E_{B4o2}$$

Die molare Extinktion des aus Brenzcatechin gebildeten Farbstoffes beträgt bei 4o2 nm 14o6o

E_{B4o2} = Extinktion des aus Brenzcatechin gebildeten Farbstoffes bei 4o2 nm
gE_{4o2} = gemessene Extinktion bei 4o2 nm
gE_{536} = gemessene Extinktion bei 536 nm
E_{H4o2} = Extinktion des aus Homobrenzcatechin gebildeten Farbstoffes bei 4o2 nm

Die Ergebnisse zeigt Abbildung 22. Homobrenzcatechin hat danach die höchste Affinität aller unter-

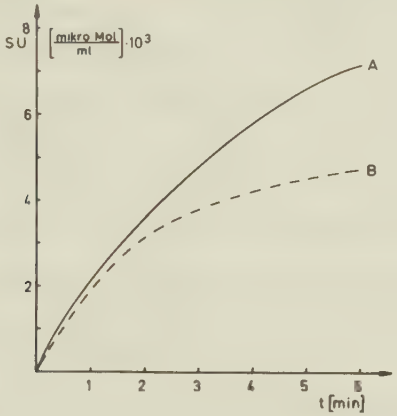


Abb. 22 Messung der Substratumsätze zweier gleichzeitig mit Catecholase umgesetzter o-Diphenole (o,oo1 mg Enzym/ml, Enzymaktivität = 18,8 E_{Cat}/mg). Standardansatz I, jedoch mit je 2,5·1o^{-7} Mol Homobrenzcatechin und Brenzcatechin/ml. A SU von Homobrenzcatechin, B SU von Brenzcatechin.

suchten o-Diphenole zur Catecholase. Daher ist der Schluß erlaubt, daß bei der Katalyse der Cresolase-Aktivität die o-Diphenole direkt am Enzym angreifen und ihre Umsetzung zu o-Chinon dabei eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang ist von beträchtlicher Bedeutung, daß es mir nicht gelang, diese o-Chinone nachzuweisen. Bei der Cresolase-Reaktion hatte ich p-Kresol eingesetzt, das mit SMBH zu Farbstoff **4** kuppelt. Setzte ich Brenzcatechin als Katalysator ein, so hätte nebenher Farbstoff **5** entstehen müssen, den ich nach dem Verfahren von S. 56

noch in Konzentrationen unter ein Promille von 4 hätte nachweisen können. Da das nicht der Fall war, muß das Chinon zusammen mit dem Enzym erneut die Hydroxylierung eines zweiten Moleküls p-Kresols katalysieren, wobei es zum o-Diphenol reduziert wird. Das dabei gebildete Homobrenzcatechin verdrängt auf Grund seiner hohen Affinität das o-Diphenol von den Catecholase-Aktivitätszentren und verhindert damit seine endgültige Dehydrierung zum o-Chinon.

3.5.4. Falls diese beiden Überlegungen richtig waren, mußten sich korrekte Vorausagen über die Reaktionskatalyse mit Homobrenzcatechin und einer gleichen Menge anderen o-Diphenols machen lassen. Der Zusatz der anderen o-Diphenole dürfte danach weder eine Erhöhung der Reaktionskatalyse bewirken, noch dürfte eine Dehydrierung der o-Diphenole stattfinden. Abbildung 23 zeigt in Kurve A die Wirkung von Homobrenzcatechin allein. Der Zusatz von Brenzcatechin, das nach Homobrenzcatechin die größte Affinität zur Catecholase hat, bewirkt eine geringfügige Verkürzung der noch verbliebenen Induktionszeit (Kurve B), während die übrigen o-Diphenole, dargestellt am Beispiel der 3,4-Dihydroxybenzoesäure, wahrscheinlich durch kompetitive Hemmung des Homobrenzcatechins, eine kleine Verlängerung der Induktionsperiode bewirken (Kurve C). Der optimale Wert der Cresolase-Aktivität wird praktisch überhaupt nicht beeinflußt. Er hängt offensichtlich vom Er-

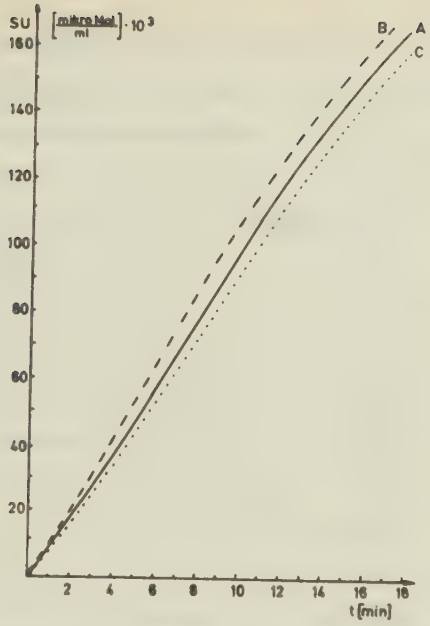


Abb. 23 Abhängigkeit der Cresolase-Aktivität einer high-Cresolase-Präparation vom gleichzeitigen Zusatz an Homobrenzcatechin und einem weiteren o-Diphenol (0,005 mg Enzym/ml, Enzymaktivität/mg E_{Cat}/E_{Cres} = 18,8/2,5). A Standardansatz II, B Standardansatz II + $2{,}5 \cdot 10^{-8}$ Mol Brenzcatechin/ml, C Standardansatz II + $2{,}5 \cdot 10^{-8}$ Mol 3,4-Dihydroxy-benzoesäure/ml.

reichen einer optimalen Homobrenzcatechinkonzentration aus umgesetzten p-Kresol ab. Weder in Reaktion B noch in Reaktion C ließ sich die Bildung von o-Chinon aus den zugesetzten o-Diphenolen nachweisen.

3.5.5. Aus Abbildung 21 ist nicht zu ersehen, daß die optimale Cresolase-Aktivität von der Art des zugesetzten o-Diphenols unabhängig ist, weil sie

im Verlauf der Meßzeit nicht erreicht wird. Verdoppelt man aber die eingesetzte Enzymmenge, ohne die sonstigen Bedingungen zu verändern, wird

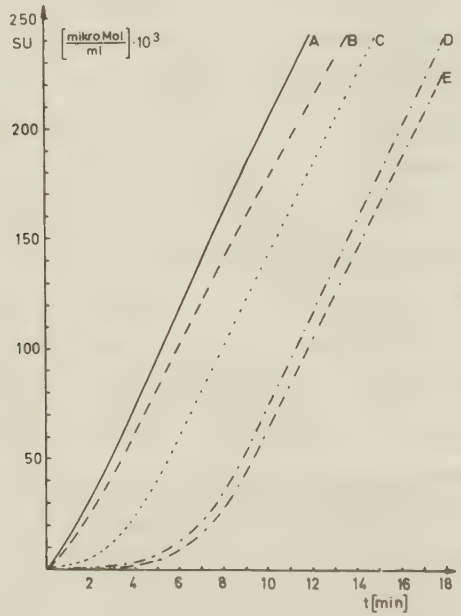


Abb. 24 Abhängigkeit der Cresolase-Aktivität einer high-cresolase-Präparation vom Zusatz verschiedener o-Diphenole (0,01 mg Enzym/ml, Enzymaktivität/mg E_{Cat}/E_{Cres} = 18,8/2,5). Standardansatz II, jedoch anstelle von Homobrenzcatechin $2{,}5 \cdot 10^{-8}$ Mol/ml
A Homobrenzcatechin, B Brenzcatechin, C Pyrogallol, D 3,4-Dihydroxy-benzoesäure, E 3-Methoxybrenzcatechin

jedoch in jedem Falle der optimale, für jedes o-Diphenol gleiche Cresolase-Aktivitätswert gemessen, wie in Abbildung 24 an fünf Beispielen dargestellt ist.

3.5.6. Eine Erscheinung, die bisher noch nicht näher besprochen wurde, ist die Tatsache, daß die Cresolase-Aktivität, nachdem die Reaktion einmal im Gang ist, bei high-cresolase-Präparationen bis zu einem optimalen Wert ansteigt. In den vorangegangenen Versuchen wurde schon dargestellt, daß offenbar eine Erhöhung der Homobrenzcatechinkonzentration bis zu einem maximalen Wert dafür verantwortlich ist. Bedenkt man aber das Verhältnis von Catecholase- zu Cresolase-Aktivität, welches in high-cresolase-Präparationen immer noch vier zu eins ist, so ist eine solche Zunahme des Homobrenzcatechin im System nur zu erklären, wenn man eine beträchtliche Hemmung der Catecholase-Aktivität durch das Monophenol annimmt. Diese kompetitive Hemmung wird durch die steigende Menge Homobrenzcatechin aufgehoben, bis sich das Gleichgewicht zwischen Hydroxylierung des Monophenols und Dehydrierung des Diphenols eingestellt hat. Mit dieser einfachen Erklärung ist aber das Verhalten von low-cresolase-Präparationen nicht zu deuten, die bei Zugabe einer nicht optimalen Menge Homobrenzcatechin keine Erhöhung der Cresolase-Aktivität im Meßverlauf zeigen (S. 51, Abb. 19, Kurve C). Nimmt man aber an, daß die Cresolase-Aktivitätszentren gleichzeitig auch Catecholase-Aktivität besitzen, wird eine Erläuterung möglich, ohne daß vorausgesetzt werden muß, daß high-cresolase- und

low-cresolase-Präparationen nach unterschiedlichen Reaktionsmechanismen reagieren. Das Postulat, daß die Cresolase-Aktivitätszentren gleichzeitig auch Catecholase-Aktivität besitzen, wurde in anderem Zusammenhang auch schon von Pomerantz erhoben (38). Es wird noch durch die Tatsache gestützt, daß beim Einsatz der gleichen E_{Cres}/ml eine low-cresolase-Präparation offenbar zur Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit die gleiche Menge Homobrenzcatechin benötigt wie eine high-cresolase-Präparation. Die low-cresolase-Präparation enthält dann aber insgesamt eine weitaus höhere Catecholase-Aktivität/ml, die normalerweise zu einem Abbau dieser maximalen Homobrenzcatechinkonzentration führen muß. Da das nicht der Fall ist, ist der Schluß zulässig, daß die nicht an ein Cresolase-Aktivitätszentrum gebundene Catecholase-Aktivität durch das Monophenol fast vollständig gehemmt ist, während die an ein Cresolase-Aktivitätszentrum gebundene für eine Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Hydroxylierung des Monophenols und Dehydrierung des o-Diphenols sorgt. Darin impliziert ist die Schlußfolgerung, daß Hydroxylierung und Dehydrierung in zwei verschiedenen Reaktionsschritten stattfinden. Dies wird vom Verhalten der high-cresolase-Präparationen bestätigt, die ihre maximale Aktivität ja durch eine Zunahme der Homobrenzcatechinkonzentration erhalten.

3.5.7. Eines der Hauptmerkmale der Catecholase-Aktivität ist die irreversible Reaktionsinaktivierung, die, wie ich zeigen konnte, auf einer irreversiblen Oxydation des Cu^{+} zum Cu^{2+} beruhen dürfte. Diese Art der Reaktionsinaktivierung zeigt die Cresolase-Aktivität nicht, denn sonst wäre ein linearer Reaktionsverlauf, wie er bei der Hydroxylierung aller verwendtbaren Monophenole auftritt, nicht denkbar. Dennoch beobachtet man nach einer gewissen Zeit eine Inaktivierung, von der high-cresolase-Präparationen stärker betroffen sind als low-cresolase-Präparationen. Man kann die Tatsache, daß es sich um eine andere Art der Inaktivierung als der irreversiblen Oxydation von Cu^{+} zu Cu^{2+} handelt, aus dem Verhalten von low-cresolase-Präparationen gegenüber einem überschüssigen Zusatz an verschiedenen o-Diphenolen ableiten. Wählt man den Zusatz so, daß nur ein geringer Überschuß an o-Diphenol vorhanden ist, so sollte die optimale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden, die unabhängig von der Art der eingesetzten o-Diphenole ist. Abbildung 25 zeigt dieses am Beispiel von Homobrenzcatechin (Kurve A), Brenzcatechin (Kurve B) und 3,4-Dimethyl-brenzcatechin und 3,4-Dihydroxybenzoesäure, deren Verhalten sich kaum unterscheidet (Kurve C). Die geringen Unterschiede der Kurven lassen sich zwanglos erklären, weil in Kurve A der Überschuß an Homobrenzcatechin durch die

Catecholase-Aktivität abgebaut wird und die Messung der Cresolase-Aktivität überlagert. Brenzcatechin führt dagegen offenbar im Überschuß zu einer geringen, kompetitiven Hemmung und verhindert dadurch das Erreichen der maximalen Aktivität. Eine gerin-

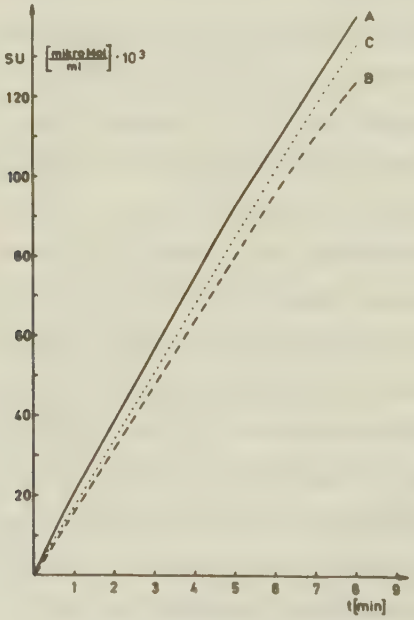


Abb. 25 Abhängigkeit der Cresolase-Aktivität einer low-cresolase-Präparation vom Zusatz verschiedener o-Diphenole im geringen Überschuß (0,12 mg Enzym/ml, Enzymaktivität/mg E_{Cat}/E_{Cres} = 15,7/0,116). Standardansatz II, jedoch anstelle von Homobrenzcatechin 2,5. 10^{-8} Mol/ml A Homobrenzcatechin, B Brenzcatechin, C 3,4-Dimethylbrenzcatechin, bezw. 3,4-Dihydroxy-acetophenon.

ge Dehydrierung des überschüssigen Brenzcatechins konnte in diesem Ansatz nach dem Verfahren auf S.

56 nachgewiesen werden.

Wiederholt man den Versuch, indem man die Enzymmenge auf die Hälfte reduziert, so reduziert sich die Cresolase-Aktivität beim Zusatz von Homobrenzcatechin (Abb. 26, Kurve A), Brenzcatechin und 3,4-Di-

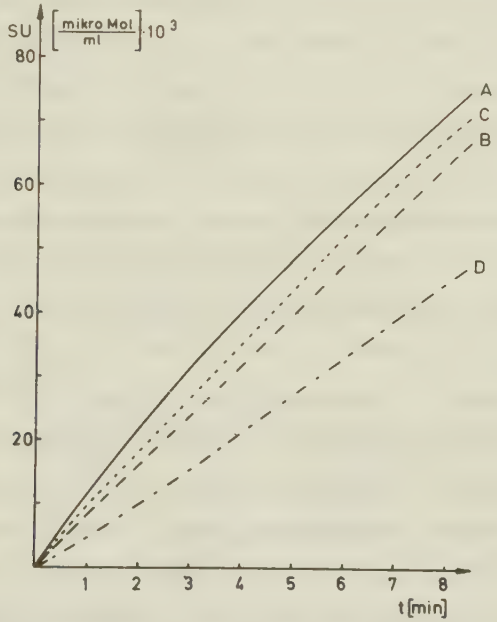


Abb. 26 Abhängigkeit der Cresolase-Aktivität einer low-cresolase-Präparation vom Zusatz verschiedener o-Diphenole im größeren Überschuß (0,006 mg Enzym/ml, enzymaktivität/mg E_{Cat}/E_{Cres} = 15,7/ 0,116). Standardansatz II, jedoch anstelle von Homobrenzcatechin 2,5. 10^{-8} Mol/ml A Homobrenzcatechin, B Brenzcatechin, C 3,4 Dimethyl-brenzcatechin, D 3,4-Dihydroxy-benzoesäure.

methyl-brenzcatechin (Kurve C u. B) annähernd auf die Hälfte. Dagegen zeigt 3,4-Dihydroxy-benzoesäure

(Kurve D) als Katalysator eine viel zu geringe Aktivität. Das kann nicht auf kompetitive Hemmung zurückzuführen sein, denn dann müßte 3,4-Dimethylbrenzcatechin, das fast genau die gleiche Aktivität gegenüber der Cresolase besitzt (siehe Tab.3 und Abb. 21), sich ähnlich verhalten. Brenzcatechin, das eine noch stärkere Affinität zur Cresolase aufweist, bewirkt aber nicht einmal eine so starke Erniedrigung der Aktivität. Man muß daher annehmen, daß zu Beginn der Reaktion, bevor genügend Homobrenzcatechin gebildet ist, um die 3,4-Dihydroxy-benzoesäure von den Cresolase-Aktivitätszentren zu verdrängen, im geringen Maß eine Dehydrierung erfolgt, die zu einer irreversiblen Oxydation des Cu^{+} zum Cu^{2+} führt. Dadurch sinkt die Cresolase-Aktivität überdurchschnittlich ab. Nachdem das Homobrenzcatechin die 3,4-Dihydroxy-benzoesäure von den Aktivitätszentren verdrängt hat, kommt dieser Vorgang zum Stillstand, die Kurve verläuft linear. Wenn später ein erneuter Abfall der Aktivität einsetzt, so kann das nicht mehr auf die Oxydation des Kupfers zurückgeführt werden.

3.5.8. Eine Hypothese, die eine Deutung dieses Aktivitätsverlustes erlaubt, kann sich auf die Ergebnisse von Jolley, Robb und Mason stützen, die fanden, daß sich das Eiweißmolekül der Phenoloxydase aus vier Untereinheiten aufbaut. Diese Untereinheiten besitzen immer noch eine beträchtliche Cat-

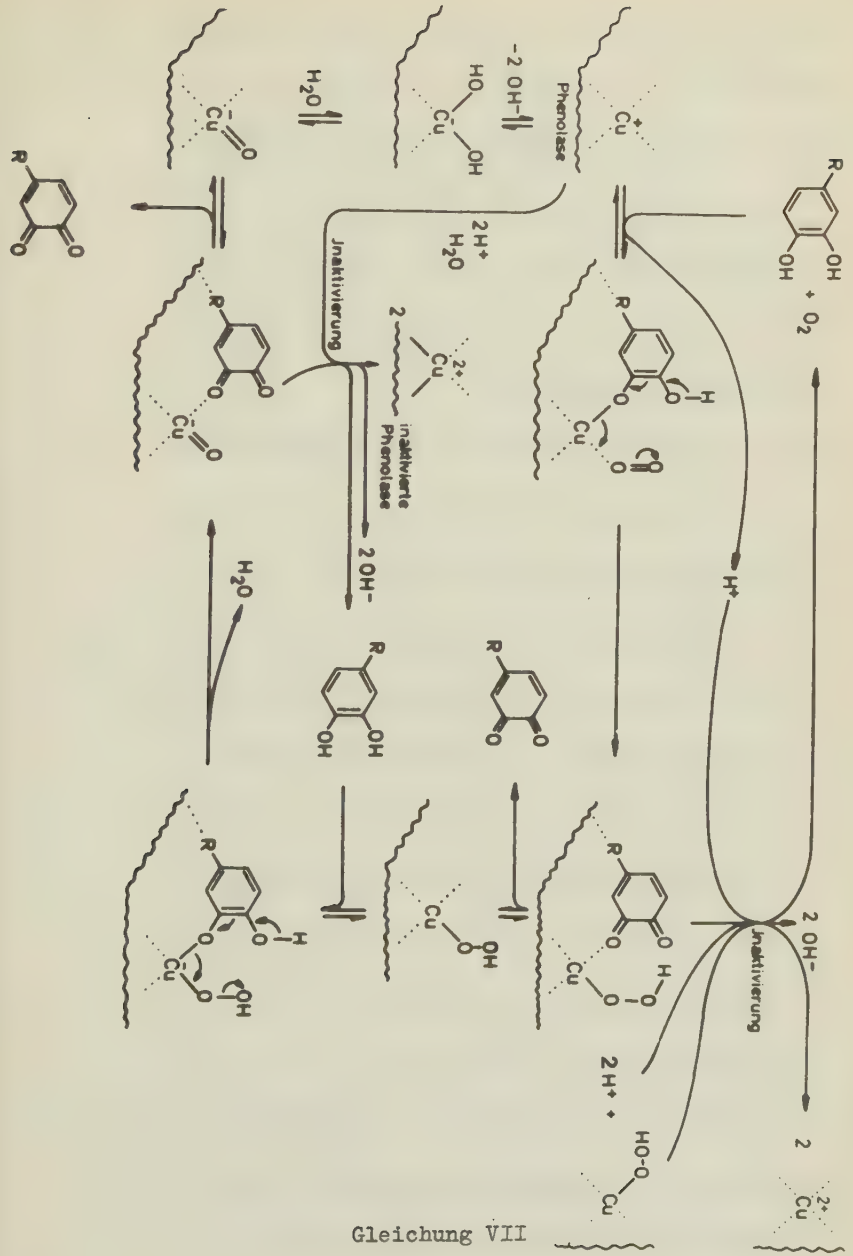
echolase-Aktivität, während die Cresolase-Aktivität zumindestens eingeschränkt ist (1o,62). Nimmt man nun an, das die Inaktivierung auf einer Dissoziation in die Untereinheiten beruht, die womöglich auch zu Isoenzymen ohne Cresolase-Aktivität zusammentreten können (13), so wäre damit auch der Unterschied zwischen high-cresolase- und low-cresolase-Präparationen erklärt. Während der Reaktion müßte die Inaktivierung also von high-cresolase zu low-cresolase führen, wobei verständlich wird, daß low-cresolase von dieser Art der Reaktionsinaktivierung weniger betroffen ist (5o).

3.6. Zum Reaktionsmechanismus der Catecholase-Aktivität.

3.6.1. Aus meinen Untersuchungen zur Catecholase-Aktivität konnte ich das wesentliche Postulat des von Hamilton (19) vorgeschlagenen Mechanismus, die "zwei Schritt - vier Elektronenreduktion" des O_2, bestätigen. Neu dagegen ist die Erklärung der irreversiblen Reaktionsinaktivierung durch eine Oxydation des Cu^+ zum Cu^{2+}. Bei den Untersuchungen der Cresolase-Aktivität einer low-cresolase-Präparation hatte es sich gezeigt, daß nur ein Überschuß an 3,4-Dihydroxy-benzoesäure zu einer auf Oxydation des Kupfers beruhenden Reaktionsinaktivierung der Cresolase-Aktivitätszentren führt. Dagegen vermag Brenzcatechin, das die Catecholase-Aktivitätszentren normalerweise ebenfalls beträcht-

lich inaktiviert, offenbar nur kompetitiv hemmend auf die Cresolase-Aktivitätszentren einzuwirken. Daraus ergibt sich, daß der Chinon-Substrat-Komplex, der ja für die Oxydation des Kupfers verantwortlich ist, das Kupfer in den Cresolase-Aktivitätszentren schlechter angreifen kann als in den Catecholase-Aktivitätszentren. Das deckt sich mit der Erfahrung, daß high-catecholase-Präparationen leichter inaktiviert werden als high cresolase-Präparationen (42). Gleichzeitig bestätigt es indirekt, daß die Inaktivierung erst durch das Zusammentreffen des Enzym-Chinon-Komplexes mit einem nicht besetzten Aktivitätszentrum ausgelöst wird, weil auch im Zuge der Cresolase-Wirkung eine große Menge Enzym-Chinon-Komplex entsteht, ohne das eine Inaktivierung eintritt. Durch den großen Überschuß an Monophenol im Ansatz sind aber unbesetzte Aktivitätszentren während der Cresolase-Reaktion fast ausgeschlossen.

3.6.2. Berücksichtigt werden muß noch das Ergebnis des Versuches zur Bestimmung der Catecholase-Aktivität bei gleichzeitigem Einsatz von Homobrenzcatechin und Brenzcatechin. Es zeigt nämlich, daß die Stabilität des Enzym-Substratkomplexes jedenfalls nicht nur von der Ausbildung der Bindung einer Hydroxygruppe an das Cu^{+}, die vielleicht die v_o bestimmt, sondern auch vom Rest des eingesetzten o-Diphenols abhängt. Da sich der Methylrest des Homobrenzcate-



Gleichung VII

chins als besonders wirkungsvoll erweist, könnten hier van der Waal'sche Kräfte eine Rolle spielen.

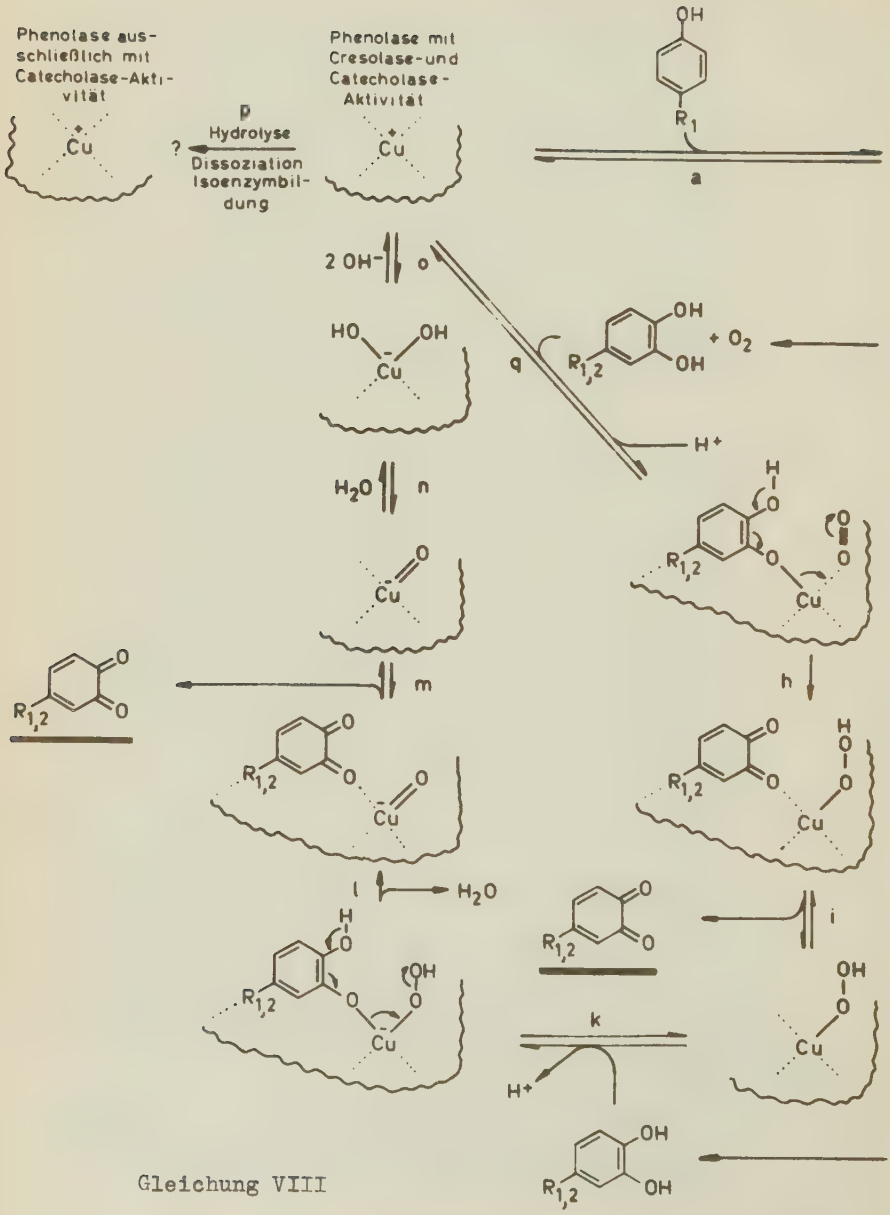
3.6.3. Die Darstellung des Reaktionsmechanismus bei der Catecholase-Reaktion der Phenoloxydasen beruht auf den Vorstellungen, die Hamilton (19) erarbeitet hat (Gleichung III). In Gleichung VII wurden zusätzlich die neuen Vorstellungen zur Reaktionsinaktivierung und zur Bindung des Enzym-Substratkomplexes aufgenommen.

3.7. Zum Reaktionsmechanismus der Cresolase-Aktivität.

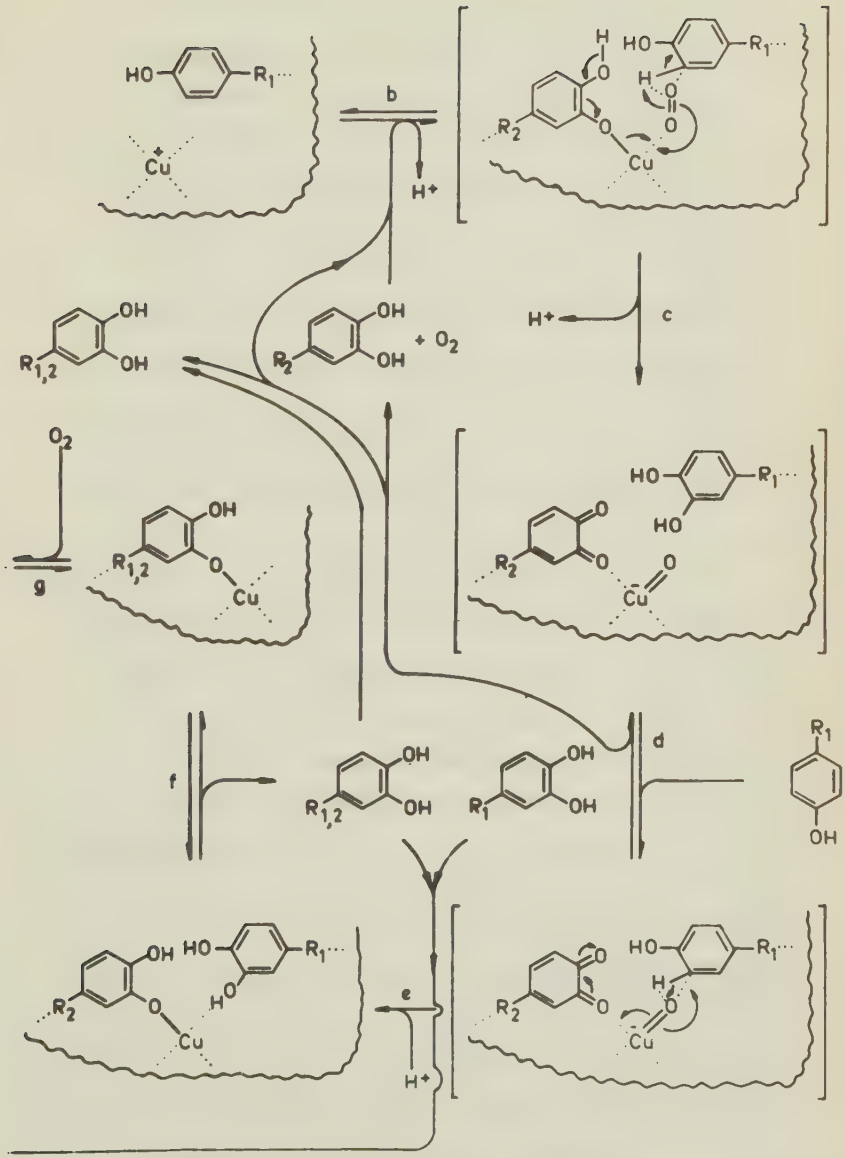
3.7.1. Ein Schema eines Mechanismus für die Cresolase-Reaktion muß davon ausgehen, daß die Catecholase-Aktivität ein integrierter Bestandteil der Catecholase-Aktivität ist. Dementsprechend wurde bei der Formulierung in Gleichung VIII versucht, die Elektronenübergänge und Enzym-Substrat-Komplexe soweit als möglich an das Hamilton'sche Schema anzulehnen. Falls das nicht möglich war, habe ich versucht, Widersprüch zur Arbeit von Bright, Wood und Ingraham (63) zu vermeiden. Die Autoren diskutieren den Einfluß von Cu^{+} auf die Bindungsfestigkeit des Sauerstoffmoleküls im Zusammenhang mit der Rolle des Kupfers in der Phenoloxydase. Dennoch sollen die vorgeschlagenen Elektronenübergänge keinesfalls als Interpretation der wahren Verhältnisse gedacht sein sondern als deren summarische Zusammenfassung. Das soll durch die Klammern ausgedrückt werden.

3.7.2. Einleitender Schritt bei der Hydroxylierung des Monophenols ist offenbar die Ausbildung eines Komplexes mit dem Enzym (a). In diesen Komplex treten ein o-Diphenol und ein O_2 ein (b). Es erfolgt Hydroxylierung des Monophenols unter Dehydrierung des o-Diphenols (c). Das neuentstandene o-Diphenol wird durch ein weiteres Monophenol verdrängt (d) und selbst hydroxyliert, wobei das intermediär entstandene o-Chinon wieder zwei Elektronen aufnimmt, um ebenfalls zum o-Diphenol reduziert zu werden (e). Daß zunächst zwei Monophenole von einem O_2 hydroxyliert werden, ergibt sich aus den unter 3.5.1. - 3.5.4. dargestellten Versuchen. Im weiteren Verlauf der Reaktion wird aus dem nach Schritt e entstandenem Komplex ein weiteres o-Diphenol freigesetzt (f). Der verbleibende Enzym-o-Diphenol-Komplex ist danach nicht in der Lage, erneut die Hydroxylierung eines Monophenols zu katalysieren, weil ein solches nicht eingelagert werden kann, und wird in üblicher Weise dehydriert (g - o). Das erklärt, warum im Verlauf der Reaktion offenbar immer gerade so viel o-Diphenol dehydriert wird, wie Monophenol hydroxyliert wird. Gleichzeitig zeigt es, daß die Hydroxylierung nur durch den Angriff eines Monophenols auf das Enzym eröffnet wird.

Die Lage des Gleichgewichtes wird im Verlaufe der Reaktion wesentlich vom freigesetzten o-Diphenol



Gleichung VIII


HO
R1
Cu
b
H+
H
O
R2
c
OH
R1,2
+ O2
O2
g
f
d
R1
OH

bestimmt. Die Menge des in Schritt a gebildeten Enzym-Monophenol-Komplexes ist bei genügendem Überschuß des Monophenols konstant. Sein weiterer Abbau wird in high-cresolase-Präparationen durch die steigende Menge o-Diphenol immer mehr beschleunigt. Daraus ist zu schließen, daß eine Dehydrierung des o-Diphenols durch direkten Angriff auf das Enzym (q) vom Monophenol fast völlig gehemmt ist. In low-cresolase-Präparationen ist die direkte Catecholase-Aktivität jedoch wenigstens noch so groß, daß sie die Vermehrung des im System verbleibenden o-Diphenols im weiten Konzentrationsbereich vor Erreichen der optimalen Konzentration verhindern kann.

3.7.3. Sind die Reste des Monophenols (R_1-) und des o-Diphenols, das zur Katalyse eingesetzt wird, verschieden (R_2-), so zeigt sich, daß der nach Schritt c entstehende Komplex aus Enzym und Chinon stabil ist, bis der Angriff eines weiteren Monophenols erfolgt. Das ergibt sich daraus, daß der Nachweis eines Chinons mit dem Rest R_2- auch dann nicht gelingt, wenn es aus einem o-Diphenol stammt, daß eine geringere Affinität zum Enzym hat, als das zum Monophenol korrespondierende o-Diphenol. Diese Tatsache beweist auch, daß bei Schritt f immer das o-Diphenol ausgeschieden wird, das eine geringere Affinität zum Enzym hat. Aus der entstehenden Mischung zweier verschiedener o-Diphenole ($R_{1,2}$-) reagiert

ebenfalls nur das mit der größeren Affinität weiter. Erst ein großer Überschuß an o-Diphenol mit dem Rest R_2- führt zu einem Angriff am Cresolase-Aktivitätszentrum (geringe kompetitive Hemmung) und am Catecholase-Aktivitätszentrum (Nachweis geringer Mengen o-Chinon mit dem Rest R_2-).

3.7.4. Mit dem vorgeschlagenen Mechanismus kann sehr gut die Tatsache in Einklang gebracht werden, daß Reduktionsmittel die Induktionszeit der Cresolase-Aktivität senken (2o,23), während Oxydationsmittel sie verlängern (2o). Reduktionsmittel vermögen aus den gebildeten o-Chinonen die zur Katalyse erforderlichen o-Diphenole zurückzubilden, während Oxydationsmittel ihre Konzentration durch zusätzliche Dehydrierung gerade senken. Die im Mechanismus vorgeschlagenen Reaktionen, die zur Inaktivierung der Cresolase-Aktivität führen (p), sind dagegen Hypothesen, die sich deswegen anboten, weil eine irreversible Oxydation des Cu^+ zum Cu^{2+} wie bei der Catecholase-Aktivität ausgeschlossen ist. Sie stammen vor allen Dingen aus den Arbeiten Masons und seiner Mitarbeiter (13,62), Fling, Horowitz und Heinemann (1o) und Behm und Nelson (5o).

3.7.5. Eine Aktivierung der Cresolase-Aktivität durch Aufnahme von Elektronen am Cu^+, wie Mason vorschlägt (3), kann durch meine Ergebnisse zur irreversiblen Inaktivierung der Catecholase-Aktivität ausgeschlossen werden.

4. Zusammenfassung

Eine neue Bestimmungsmethode der Cresolase- und der Catecholase-Aktivität, beruhend auf der Kondensation nascierender Chinone mit Hydrazonen, wurde entwickelt und 3-Methyl-6-natriumsulfonyl- benzthiazolon-(2)-hydrazon als geeignetes Kondensationsmittel gefunden. Die chemischen Vorgänge, auch beim Einsatz verschiedener Phenole,konnten mit Hilfe chemischer und spektroskopischer Methoden geklärt werden.

Bei der Untersuchung der Catecholase-Aktivität konnte insbesondere gezeigt werden, daß die irreversible Reaktionsinaktivierung auf einer Oxydation des einwertigen Kupfers im Enzym zur zweiwertigen Form beruht. Die "Zwei Schritt- Vier Elektronenreduktion" des O_2 wurde bestätigt und die Bedeutung der Reste verschiedene o-Diphenole für die Stabilität der Enzym-Substrat-Komplexe untersucht.

Die Cresolase-Aktivität wurde insbesondere unter dem katalytischen Einfluß verschiedener o-Diphenole untersucht. Das Verhalten von low- und high-cresolase-Präparationen war unterschiedlich. Zur Erklärung dieser Unterschiede stellte ich einen Reaktionsmechanismus auf, der sie auf das ungleiche Verhältnis von Catecholase- zu Cresolase-Aktivität solcher Präparationen zurückführt. Ich konnte feststellen, daß ein Mol o-Diphenol die Hydroxylierung

zweier Mol Monophenol durch ein Mol O_2 katalysiert. Die gleichzeitige Bindung der Catecholase-Aktivität an ein Cresolase-Aktivitätszentrum konnte bestätigt werden. Gleichzeitig wies ich nach, daß die nicht an ein Cresolase-Aktivitätszentrum gebundene Catecholase-Aktivität im Verlauf der Cresolase-Reaktion kaum eine Rolle spielt. Insgesamt muß die Catecholase-Aktivität als Funktion der Cresolase-Aktivität aufgefaßt werden. Die Ursachen der Reaktionsinaktivierung der Cresolase-Aktivtät wurde unter dem Gesichtspunkt diskutiert, daß sie nicht auf eine irreversible Oxydation des Kupfers im Enzym zurückzuführen ist. Eine Aktivierung der Cresolase-Aktivitätszentren durch Aufnahme von Elektronen am Cu^+ wurde ausgeschlossen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Inhaltsverzeichnis

Allgemeine Angaben (5.2.)..... 79
Allgemeine Vorschrift zur Isolierung von p-Benzochinon-azinen aus Ansätzen mit Phenol, Hydrazon und Phenoloxydase (5.3.)..... 79
[3-Methyl-benzthiazolon-(2)-]-[5-hydroxy-p-benzochinon]-azin (5.4.)..... 8o
[3-Methyl-benzthiazolon-(2)-]-[5-hydroxy-2-methyl-p-benzochinon]-azin (5.5.)..... 8o
[3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-]-[2-methyl-5-hydroxy-p-benzochinon]-azin (5.6.)..... 81
[3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-]-[5-hydroxy-p-benzochinon]-azin (5.7.)..... 81
[3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-]-[3-methoxy-5-hydroxy-p-benzochinon]-azin (5.8.)..... 82
[3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-]-[3,5-dihydroxy-p-benzochinon]-azin (5.9.)..... 82
[3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-]-[2,3-dimethyl-p-benzochinon]-azin (5.1o.)..... 83
Synthese einer unbekannten Substanz aus nicht kupplungsfähigen o-Diphenolen mit SMBH (5.11.)..... 83
3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon (5.12.)..... 86
4-N-Methyl-sulfanilsäure aus 3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon (5.13.)..... 87

5.2. Allgemeine Angaben

Die Schmelzpunkte sämtlicher angegebenen Verbindungen liegen über 340°C und ließen sich nicht bestimmen. Auf CH-Analysen aus Natriumsalzen wurde verzichtet; soweit sich die Säuren nicht rein isolieren ließen, stützen sich die Analysendaten ausschließlich auf N- und S-Werte.

Sämtliche UV-Messungen wurden in einem ZEISS-Photometer M 4 Q II ausgeführt.

Die IR-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Spektralphotometer (Modell 237) in Kaliumbromid angefertigt.

Zur Aufnahme der NMR-Spektren diente ein VARIAN-A-60-Gerät (Tetramethylsilan als innerer Standart). Als Lösungsmittel wurde, soweit nichts anderes angegeben, $DMSO_{d6}$ verwendet.

Die Ausbeutenberechnung bezieht sich immer auf das endgültig gereinigte Präparat und enthält gegebenenfalls einen beträchtlichen Verlust durch mehrfaches Umkristallisieren.

5.3. Allgemeine Vorschrift zur Isolierung von p-Benzochinon-azinen aus Ansätzen mit Phenol, Hydrazon und Phenoloxydase

0,0025 Mol Phenol und 0,0025 Mol Hydrazon werden unter N_2 in hundert Milliliter Mac-Ilvain-Puffer von pH 6,80 gelöst und die Lösung bei 25°C mit 400-600 ml Luft/min begast. Im Zeitraum mehrerer Stunden gibt man eine konzentrierte Phenoloxydase-Lösung in

kleinsten Anteilen dazu, bis ihre Konzentration ungefähr 1ooo E_{Cat} im Ansatz beträgt. Nach einer weiteren Stunde wird durch eine G 4 Glasfritte abgesaugt und der Niederschlag mit Wasser gewaschen. Man erhitzt ihn dann in Aceton zum Sieden, saugt erneut durch eine G 4 Fritte ab und kristallisiert aus dem jeweils angegebenen Lösungsmittel um. Die so gewonnenen Substanzen werden im Vakuum bei 13o°C getrocknet.

5.4. [3-Methyl-benzthiazolon-(2)-]-[5-hydroxy-p-benzochinon]-azin **1**

Aus 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon (64) und Brenzcatechin nach Vorschrift 5.3. mit 2o % Methanol. Umkristallisiert aus Glykol-monoaethylaether.

$C_{13}H_{11}N_3O_2S$ (285,32), Ausbeute: o,2 g (25% d.Th.)

Ber.: C 58,93 %, H 3,89 %, N 14,73 %, S 11,21 %

Gef.: C 58,72 %, H 4,11 %, N 14,69 %, S 11,oo %

5.5. [3-Methyl-benzthiazolon-(2)-]-[5-hydroxy-2-methyl-p-benzochinon]-azin **2**

Aus 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon und Homobrenzcatechin nach Vorschrift 5.3. mit 2o % Methanol. Umkristallisiert aus Eisessig.

$C_{15}H_{13}N_3O_2S$ (299,36) Ausbeute: o,2 g (22% d. Th.)

Ber.: C 6o,19 %, H 4,38 %, N 14,o1 %, S 1o,o2 %

Gef.: C 6o,3o %, H 4,41 %, N 14,19 %, S 9,95 %

5.6. [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-]-[2-methyl-5-hydroxy-p-benzochinon]-azin **4**

Aus SMBH und Homobrenzcatechin oder p-Kresol nach Vorschrift 5.3. Umkristallisieren aus Wasser.

$C_{15}H_{12}NaN_3O_5S_2$ Ausbeute: o,1 g (1o% d. Th.)
(4o1,42)

Ber.: N 1o,37 %, S 15,9o %

Gef.: N 1o,11 %, S 15,89 %

5.7. [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-]-[5-hydroxy-p-benzochinon]-azin **5**

Aus SMBH und Brenzcatechin nach Vorschrift 5.3. Umkristallisieren aus Wasser.

$C_{14}H_{1o}NaN_3O_5S_2$ Ausbeute: o,1 g (11% d. Th.)
(387,36)

Ber.: N 1o,78 %, S 16,45 %

Gef.: N 1o,96 %, S 16,36 %

IR-Banden in KBr (cm^{-1}): 34oo (s), 16o5 (s), 155o (s), 1435 (s), 142o (s), 131o (s), 1215 (s), 1195 (s), 1o3o (s), 945 (m), 865 (s), 83o (w), 817 (w).

NMR-Signale (ppm): 9,72 (s), austauschbar mit D_2O, ein Proton; 8,1o - 7,oo (m), fünf Protonen; 6,49 (d), ein Proton; 3,83 (s), drei Protonen.

5.8. [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-]-[3-methoxy-5-hydroxy-p-benzochinon]-azin **6**

Aus SMBH und 3-Methoxy-brenzcatechin nach Vorschrift 5.3. Umkristallisieren aus Wasser.

$C_{15}H_{12}NaN_3O_6S_2$ (417,5o) Ausbeute: o,o5 g (4,7% d.Th.)

Ber.: N 1o,o8 %, S 15,36 %

Gef.: N 1o,11 %, S 15,43 %

IR-Banden in KBr (cm^{-1}): 34oo (s), 16o2 (s), 156o (s), 148o (s), 143o (s), 141o (s), 13o5 (m), 1215 (s), 1195 (s), 1o3o (s), 94o (w), 865 (s), 83o (w), 815 (w).

NMR-Signale (ppm): 9,98 (s), austauschbar mit D_2O, ein Proton; 8,o2 - 7,15 (m), vier Protonen; 6,52 (s), ein Proton; 3,8o (2s), sechs Protonen.

5.9. [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-]-[3,5-dihydroxy-p-benzochinon]-azin **7**

Aus SMBH und Pyrogallol nach Vorschrift 5.3. Umkristallisieren aus Wasser.

$C_{14}H_{11}NaN_3O_6S_2$ (4o4,37) Ausbeute: o,1 g (9 % d. Th.)

Ber.: N 1o,38 %, S 15,9o %

Gef.: N 1o,5o %, S 16,o1 %

IR-Banden in KBr (cm^{-1}): 339o (s), 161o (s), 155o (s), 134o (s), 1215 (s), 118o (s), 1o3o (s), 955 (m), 86o (s), 81o (w), 79o (w).

NMR-Signale (ppm): 9,88 und 9,63 (2s), zwei Protonen,

austauschbar mit D_2O; 8,oo - 7,35 (m), vier Protonen; 6,82 (s), ein Proton; 3,74 (s), drei Protonen.

5.1o. [3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)- - [2,3-dimethyl-p-benzochinon]-azin **8**

Aus SMBH und 3,4-Dimethyl-brenzcatechin (65) nach Vorschrift 5.3. Umkristallisieren aus Wasser.

$C_{16}H_{14}NaN_3O_5S_2$ (415,54) Ausbeute: o,2 g (18% d. Th.)

Ber.: N 1o,13 %, S 15,44 %

Gef.: N 1o,o7 %, S 15,49 %

IR-Banden in KBr (cm^{-1}): 342o (m), 1612 (m), 157o (s), 148o (m), 141o (m), 1295 (m), 121o (s), 1185 (s), 1o3o (s), 93o (w), 86o (m), 82o (w), 782 (w).

NMR-Signale (ppm): 9,3o (s), ein Proton, austauschbar mit D_2O; 8,o1 - 7,37 (m), vier Protonen, 3,76, 2,29 und 2,oo (3s), je drei Protonen.

5.11. Synthese einer unbekannten Substanz aus nicht kupplungsfähigen o-Diphenolen mit SMBH

5.11.1. $5 \cdot 1o^{-3}$ Mol SMBH und $5 \cdot 1o^{-6}$ Mol 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon (66), oder 3,4-Dihydroxy-acetophenon (67), am besten jedoch 3,4-Dihydroxy-benzoesäure werden zusammen mit $5 \cdot 1o^{-3}$ Mol Natriumacetat in 1oo ml Mac-Ilvain-Puffer pH 6,8 gelöst. Man begast mit 4oo - 6oo ml Luft/min und fügt im Verlauf von ca. einer Stunde eine konzentrierte Phenolase-Lösung hinzu, bis deren Menge etwa 1ooo E_{Cat} im Ansatz beträgt.

Man sättigt die Lösung mit festem Natriumacetat und saugt den entstehenden Niederschlag durch eine G 4 Fritte ab. Nach Trocknen bei 1o5°C im Vakuum extrahiert man mit absolutem Methanol, bis dieses sich nicht mehr blau färbt. Das Methanol wird bis auf eine geringe Menge eingeengt, heiß filtriert und auskristallisieren gelassen. Das gewonnene Produkt wird erneut aus 8o % Methanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt höchstens einige Milligramm, die am besten mit IR- und UV-Spektren mit dem aus reinem SMBH gewonnenen Produkt verglichen werden.

5.11.2. $2 \cdot 10^{-3}$ Mol SMBH werden in 4o ml H_2O/Methanol gelöst und schnell in 4o ml CH_3OH mit $4 \cdot 10^{-3}$ Mol Tetrachlor-o-chinon eingegossen. Nach einer Stunde wird durch eine G 4 Fritte abgesaugt und mit Dioxan gewaschen. Man extrahiert den Rückstand mehrere Male mit siedendem Dioxan, das verworfen wird. Dann wird, wie unter 5.11.1. angegeben, mit Methanol extrahiert und umkristallisiert.

Ausbeute: 5o mg

UV-Spektrum in Methanol 7o%: λ_{max} ($E_{1\%}$): 528 nm (459), 284 nm (215); λ_{min} ($E_{1\%}$): 37o nm (92,6), 271 nm (188); Beginn einer Schulter bei λ ($E_{1\%}$): 485 nm (321); Ende der Schulter bei λ ($E_{1\%}$): 42o nm (179). Die Aufnahme erfolgte mit 1,o35 mg in 5o ml Lösung (1cm Küvette). IR-Spektrum in KBr (cm^{-1}): 344o (s), 162o (m), 1535 (m), 147o (w), 143o (s), 141o (m), 138o (s), 1335 (m),

1280 (m), 1215 (s), 1180 (s), 1125 (m), 1070 (m), 1025 (s), 945 (w), 910 (w), 865 (m), 810 (w), 790 (w), 770 (w), 750 (w), 720 (w), 695 (w), 680 (w), 630 (m).

NMR-Signale: 8,19 - 7,41 (m), Aufspaltungsmuster einer 1,2,4-Substitution am Aromaten; 3,91 (s), enthält ebenso viele Protonen wie das Multiplett; 4,10 - 2,88 (s), Mischpeak aus mit D_2O austauschbaren Protonen (NH ?) mit H_2O aus dem $DMSO_{d6}$.

5.11.3. Die Vorschrift 5.11.2. liefert dasselbe Produkt auch in Gegenwart von $2 \cdot 10^{-3}$ Mol 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon, 3,4-Dihydroxy-acetophenon, oder 3,4-Dihydroxy-benzoesäure.

5.11.4. $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ Mol SMBH und $0{,}5 \cdot 10^{-3}$ Mol 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon, 3,4-Dihydroxy-acetophenon, oder 3,4-Dihydroxy-benzoesäure werden unter N_2 gelöst in 10,00 ml Mac-Ilvain-Puffer pH 6,80. Unter den Bedingungen nach 3.3.1. fügt man 10,00 ml Phenolase-Lösung mit einer Aktivität von insgesamt 0,5 E_{Cat} hinzu und inkubiert zehn Minuten. 2,00 ml der inkubierten Lösung werden mit 1,00 ml H_2O verdünnt und mit Methanol auf 10,00 ml aufgefüllt. Das UV-Spektrum dieser Mischung, gemessen gegen Methanol 70%, zeigt im Bereich von 600 - 360 nm die gleiche Kurve, wie die nach 5.11.2. gewonnene Substanz.

5.11.5. $0{,}1 \cdot 10^{-3}$ Mol SMBH werden in 1,00 ml Mac-Ilvain-Puffer pH 6,8 und 2,00 ml H_2O gelöst und un-

ter Begasung von 4oo - 6oo ml Luft/min mit 5,oo ml einer frisch bereiteten, methanolischen Lösung versetzt, die o,4 - 4 · $1o^{-6}$ Mol reines Tetrachlor-o-chinon enthält. Nach fünf Minuten füllt man mit Methanol auf 1o,oo ml auf und mißt die Extinktion bei 528 nm gegen Methanol 7o%. Die gemessenen Extinktionen entsprechen einem Substratumsatz von 2o - 2oo mikroMol/ml im Standardansatz I bei Verwendung von 5-Pyrogallyl-phenyl-sulfon, 3,4-Dihydroxy-acetophenon, oder 3,4-Dihydroxy-benzoesäure bei Benutzung von 1 cm Küvetten.

5.12. 3-Methyl-6-natriumsulfonyl - benzthiazolon-(2)-hydrazon (SMBH) **3**

85 g 3-Methyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon werden im Eisbad in 75o g Oleum 25 % eingetragen, wobei die Temperatur nicht über 3o°C steigen soll. Man läßt bis zur vollständigen Lösung (ca 12 h) bei Raumtemperatur stehen und gießt in acht Liter Eiswasser mit überschüssigem Eis. Nach einigen Stunden filtriert man die freie Sulfonsäure ab, wäscht mit viel Wasser und trocknet. Man erhält etwa 85 g Rohprodukt. Zur Reinigung wird sie mehrmals mit siedendem Methanol ausgezogen. Anschließend schwemmt man sie in der gleichen Menge Wasser auf und löst in der äquimolaren Menge 3 N NaOH in der Hitze. Nach Filtration über Aktivkohle versetzt man mit dem doppelten Volumen Dioxan und läßt im Eisschrank auskristallisieren. Anschließend wird mehrere Male aus 1o % Natriumacetat-

lösung unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert, bis fast weiße Kristalle entstehen, die noch einmal aus Wasser rekristallisiert werden. Nach dem Waschen, zunächst mit 7o%igem, dann mit reinem Dioxan und Aether trocknet man an der Luft.

$C_8H_8NaN_3O_3S_2$ Ausbeute: 5o g (36% d. Th.)
(281,29) Analysenwerte aus freier Säure
Ber.: C 36,92 %, H 3,5o %, N 16,21 %, S 24,74 %
Gef.: C 36,73 %, H 3,76 %, N 16,o9 %, S 24,59 %

5.13. 4-N-Methyl-sulfanilsäure aus 3-Methyl-6-natriumsulfonyl-benzthiazolon-(2)-hydrazon

5.13.1. 25 g (o,1 Mol) der aus 1o %iger Lösung von **3** gefällten Säure (mit verd. HCl) werden in 3oo ml HCl conc. gelöst. Zu der Lösung fügt man nach Erwärmen auf 85° tropfenweise H_2O_2 3o % (37 ml = o,33 Mol), daß die Reaktion lebhaft in Gang bleibt. Nach Beendigung der Zugabe erhitzt man zum Sieden, bis die Lösung nur noch rötlich-braun gefärbt ist. Die Salzsäure wird im Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand durch Zugabe von Methanol zur Kristallisation gebracht. Die Reinigung des entstandenen 3-Methyl-6-sulfonyl-benzthiazolon-(2) erfolgt durch Kristallisation mit Wasser.

$C_8H_7NO_4S_2$ Ausbeute: 24 g (99 % d. Th.)
(245,28)
Ber.: C 39,18 %, H 2,88 %, N 5,72 %, S 26,19 %

Gef.: C 39,25%, H 3,13 %, N 5,5o %, S 26,o1 %

IR-Banden in KBr (cm^{-1}): 34oo (w, verbreitert), 3o7o (s), 158o (m), 1515 (m), 138o (m), 126o (m), 1235 (s), 1215 (s), 1185 (s), 1125 (s), 1o6o (s), 1o3o (s), 1o2o (s), 9oo (w) 865 (s), 82o (w), 8o5 (s).

IR-Banden des K-Salzes in KBr (cm^{-1}): 343o (s, Kristallwasser), 1635 (s), 157o (w), 1455 (m), 135o (m), 123o (s), 118o (s), 113o (s), 1o3o (s), 835 (w), 815 (w), 78o (m).

NMR-Signale des K-Salzes in D_2O (ppm): 7,95 - 7,o4 (m), drei aromatische Protonen mit 1,2,4-Substitution; 3,o4 (s), drei Protonen.

5.13.2. Das 3-Methyl-6-sulfonyl-benzthiazolon-(2) wurde analog dem 3-Methyl-6-sulfonyl-benzthiazolthion -(2) abgebaut (59) und das Endprodukt durch Vergleich der IR- und NMR-Spektren von käuflicher Substanz als 4-N-Methyl-sulfanilsäure identifiziert.

6. Literaturverzeichnis

1.) O. Hoffmann-Osenhoff, Advances in Enzymol. 14, 219 (1953)

2.) H.S. Mason, Nature (London), 177, 79 (1956)

3.) H.S. Mason, Advances in Enzymol. 19, 129 (1957)

4.) D. Keilin u. T. Mann, Proc. Roy. Soc. London 125, 187 (1938)

5.) F. Kubowitz, Biochem. Z., 292, 221 (1937)

6.) C.R. Dawson u. R.J.Magee, Method. in Enzym., Herausgeber S.P. Collowitz u. N.O. Caplan, 2, 817 (1955)

7.) M.F. Malette u. C.R. Dawson, Arch. Biochem. 23, 29 (1949)

8.) J.L. Smith u. C.R. Krueger, J. Biol. Chem. 237, 1121 (1962)

9.) S. Bouchilloux, P. McMahill u. H.S. Mason, J. Biol. Chem. 238, 1699 (1963)

10.) M. Fling, N.H. Horowitz u. S.F. Heinemann, J. Biol. Chem. 187, 793 (1950)

11.) A.B. Lerner, T.B. Fitzpatrick, E. Chalkins u. W.H. Summerson, J. Biol. Chem. 187, 793 (1950)

12.) S.H. Pomerantz, J. Biol. Chem. 238, 2351 (1963)

13.) R.L. Jolley u. H.S. Mason, J. Biol. Chem. 240, 1489 (1965)

14.) D. Kertesz u. R. Zito, Biochim. Biophys. Acta 96, 447 (1965)

15.) D. Kertesz u. R. Zito, Oxygenases, Verlag O. Hayaishi, Acad. Press. Inc. N.Y., S. 312 (1962)

16.) N.H. Horowitz, M. Fling, H. MacLeod u. Y. Watanabe, Could Spring Harbour Symposion on Quantitative Biol., 26, Long Island Biol. Ass., Could Spring Harbour, Long Island, 233 (1961)

17.) D. Kertesz, Nature (London), 18o, 5o6 (1957)

18.) T.H. Allen u. J.H. Bodine, Science 94, 433 (1941)

19.) G.A. Hamilton, Advances in Enzymol. 32, 66 (1969)

2o.) C.A. Bordner u. J.M. Nelson, J. Am. Chem. Soc. 61, 15o7 (1939)

21.) S. Naono, N. Kimoto, S. Katsuya u. K. Asanuma, Med. Osaka Univ. 6, 161 (1953)

22.) M.W. Onslow u. M.E. Robinson, Biochem. J. 22, 1327 (1928)

23.) R.C. Behm u. J.M. Nelson, J. Am. Chem. Soc. 66, 711 (1944)

24.) H.S. Mason, W.L. Fowlks u. E.W. Peterson, J. Am. Chem. Soc. 77, 2914 (1955)

25.) H.S. Raper, Physiol. Revs., 8, 245 (1928) und Erg. d. Enzymforsch., 1, 27o (1932)

26.) H.S. Mason, J. Biol. Chem. 172, 83 (1948)

27.) H.S. Mason u. C.J. Wright, J. Biol. Chem. 18o, 235 (1949)

28.) J.D. Bu'lock u. J. Harley-Mason, J. Chem. Soc. London 7o3 (1951)

29.) W.H. Miller u. C.R. Dawson, J. Am. Chem. Soc. 63, 3368 u. 3375 (1941)

3o.) J.M. Nelson u. C.R. Dawson, Advances in Enzymol. 4, 115 (1946)

31.) M.L. Cushing, J. Am. Chem. Soc. 7o, 1184 (1948)

32.) C.E.M. Pugh u. H.S. Raper, Biochem. J. 21, 137o (1927)

33.) C.R. Dawson u. W.B. Tarphy, The Enzyms II, Part 1, Herausgeber J.B. Sumner u. K. Myrbäck, Acad. Press. Inc. N.Y. 456 (1951)

34.) D.C. Gregg u. J.M. Nelson, J. Am. Chem. Soc. 62, 25oo (194o)

35.) Y. Oshima u. M. Nakatami, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 27, 5o8 (1953), zit. in C.A. 48, 12933i (1954)

36.) A.B. Lerner, Advances in Enzymol. 14, 73 (1953)

37.) D.J. Cavanaugh, J. Harris u. J.Z. Hearon, J. Am. Chem. Soc. 77, 1531 (1955)

38.) S.H. Pomerantz, J. Biol. Chem. 241, 161 (1966)

39.) C. Tsukamoto u. T. Tamiguchi, Yakugaku Zasski 77, 462 (1957), zit. in C.A. 51, Nr. 21, 166o4d (1957)

4o.) J.D. Iwanow, Ber. Akad. UdSSR 95, 1255 (1954), zit. in C. 127 Jrg., 13447 (1956)

41.) B.J. Ludwig u. J.M. Nelson, J. Am. Chem. Soc. 61, 15o7 (1939)

42.) G.G. Parkinson u. J.M.Nelson, J. Am. Chem. Soc. 62, 1693 (194o)

43.) L.J. Roth, W.H. Miller u. C.R. Dawson, nicht veröffentlicht, zit. in Advances in Enzymol. 4, 131 (1946)

44.) J. Asimov u. C.R. Dawson, J. Am. Chem. Soc. 72, 82o (195o)

45.) M. Graubard u. J.M. Nelson, J. Biol. Chem. 111, 757 (1935)

46.) M. Graubard u. J.M. Nelson, J. Biol. Chem. 112, 135 (1935)

47.) B.J. Ludwig u. J.M. Nelson, J. Am. Che. Soc. 61, 26o1 (1939)

48.) C.R. Dawson u. J.M. Nelson, J. Am. Chem. Soc. 6o, 25o (1938)

49.) R.C. Krueger, J. Am. Chem. Soc. 72, 5582 (195o) und 76, 87 (1958)

5o.) R.C. Behm und J.M. Nelson, J. Am. Chem. Soc. 66, 7o9 (1944)

51.) J.W. Sizer, J. Biol. Chem. 163, 145 (1946)

52.) H.S. Mason, C. Schwartz u. D.C. Peterson, J. Am. Chem. Soc. 67, 1233 (1945)

53.) F.G. Smith u. E. Stolz, J. Biol. Chem. 179, 879 (1949)

54.) M.H. Adams u. J.M. Nelson, J. Am. Chem. Soc. 6o, 2474 (1938)

55.) W.H. Miller, M.F. Malette, L.J. Roth u. C.R. Dawson, J. Am. Chem. Soc. 66, 514 (1944)

56.) S. Hünig u. Mitarbeiter, Angewandte Chemie, 7o, 215 (1958)

57.) G. Schenck, K.-H. Frömming u. H. Kastner, Arch. Pharmaz. 293, 251 (196o)

58.) J. Voigt u. R. Noske, Z. f. Lebensmittelunt. u. Forsch. 129, 359 (1965/66) u. 130, 9 (1966)

59.) B. Rassow, W. Döhle u. E. Reim, J. prakt. Chem. 93, 183 (1916)

60.) L. Horner u. E. Geye, Ber. 98, 2009 u. 2016 (1965)

61.) C. Tsukamoto u. T. Taniguchi, Yakugaku Zasski, 77, 462 (1957), zit. in C.A. 48, Nr. 21, 16604d (1957)

62.) R.L. Jolley, D.A. Robb u. H.S. Mason, J. Biol. Chem. 244, 1593 (1969)

63.) H.J. Bright, B.J.B. Wood u. L.L. Ingraham, Ann. N.Y. Acad. Science 100, 965 (1963)

64.) E. Besthorn, Ber. 43, 1524 (1910)

65.) W. Baker, H.F. Bondy, J. Gumb u. D. Miles, J. Chem. Soc. London 1615 (1953)

66.) L. Horner u. S. Göwecke, Ber. 94, 1267 (1961)

67.) K.W. Rosenmund u. H. Loffert, Ber. 61, 2601 (1928)

Lebenslauf

Am 7. Juni 1942 wurde ich als Sohn des damaligen Studienrates Dr. Hans Deneke und seiner Frau Lieselotte, geb. Kruskopf, in Braunschweig geboren. Von Ostern 1949 bis 1953 besuchte ich die Volksschule, zunächst in Schötmar und dann in Bad Salzuflen/Lippe. Im Frühjahr 1953 trat ich in das math. nat. Gymnasium in Bad Salzuflen ein. Weihnachten 1954 wechselte ich an das math. nat. Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen, wo ich im Februar 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Am 1.4.1962 begann ich meine Zeit als Apothekerpraktikant in der Weendertor-Apotheke in Göttingen und setzte sie bis zur bestandenen Prüfung als Apothekenanwärter im März 1964 in der Storch-Apotheke in Hannover fort. Zum Sommersemester 1964 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Bayerischen-Julius-Maximilian-Universität in Würzburg auf. Zu dieser Zeit wurde ich als Mitglied der Studienstiftung des Deutschen Volkes angenommen. Die Pharmazeutische Prüfung legte ich am 21.4.1967 ab.

Seit Mai 1967 arbeite ich am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität bei Herrn Professor Dr. G. Schenck an meiner Dissertation. Gleichzeitig erhielt ich zunächst eine Hilfsassistentenstelle am Pharmazeutischen Institut; seit Oktober 1969 bin ich dort als Wissenschaftlicher Assistent tätig.